

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS MÉTODOS DE MINI INJERTOS  
HENDIDURA, T INVERTIDA Y YEMA TERMINAL EN LA PROPAGACIÓN DE  
PLANTAS DE NARANJA VALENCIA (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.)**

**CRISTIAN CAMILO ÁLVAREZ CORREA**

**DIRECTOR**

**ISIDRO E. SUÁREZ, Ph. D.**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA  
MONTERÍA – CÓRDOBA  
2020**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS MÉTODOS DE MINI INJERTOS  
HENDIDURA, T INVERTIDA Y YEMA TERMINAL EN LA PROPAGACIÓN DE  
PLANTAS DE NARANJA VALENCIA (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.)**

**CRISTIAN CAMILO ÁLVAREZ CORREA**  
**Estudiante del programa de Ingeniería Agronómica**

**Trabajo de grado en la modalidad investigación presentado como requisito  
parcial para optar el título de Ingeniero Agrónomo**

**DIRECTOR ISIDRO E. SUÁREZ, Ph. D.**  
**Docente investigador programa de Ingeniería Agronómica**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**  
**PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**  
**MONTERÍA – CÓRDOBA**  
**2020**

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto serán responsabilidad del autor. Artículo 17, acuerdo No. 039 del 24 de junio de 2005 del Consejo Superior de la Universidad de Córdoba.

**Nota de aceptación**

---

---

**Director**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

Montería, noviembre de 2020.

## DEDICATORIA

- A Dios. Por darme la sabiduría y la fortaleza para salir adelante, también por guiar mi camino en este proceso de formación.
- A mi madre. Nancy Correa Díaz, por ser esa madre ejemplar que me hizo ser una persona de bien, con principios y valores. Por el apoyo en el transcurso de mi carrera universitaria, también por darme la motivación para no desfallecer en los momentos difíciles.
- A mi hija. Salomé Álvarez Blanquiceth por ser mi moral para lograr mis objetivos y las ganas seguir avanzando en mi formación como profesional. Por estar a mi lado frente a las adversidades que se presentan.
- A mi padre. Domingo Orlando Álvarez Berrocal, que en vida me inculcaste el valor de la responsabilidad, el cual apliqué y me sirvió para lograr lo que soy hoy día. Desde el cielo me estás dando la motivación para lograr lo que en tu nombre me propuse.
- A mi esposa. Kellys Blanquiceth Londoño, por estar a mi lado en todo este tiempo de formación y por luchar conmigo, pese a los obstáculos. Por ser esa persona motivadora, valiente y de mente emprendedora.

A mis hermanos. Dayanis Álvarez, Luz Álvarez, Wilkin Álvarez, Edwin Álvarez, Luis Álvarez y Keider Álvarez, por ese apoyo incondicional, que sin duda me sirvió de mucho para poder lograr este nuevo paso, también por todos los consejos que me ayudaron a enriquecer mis ideas en este proyecto de vida.

A mis amigos. Antonio Palomino, José Chica, Juan Alemán, Jhoan Pulgarin, Rafael Echeverría, María Díaz, Sandra Fernández y Alberto Arrieta, por estar siempre presentes en éste, el inicio de mi proyecto de vida y por todo el tiempo de acompañamiento en mi proceso como profesional.

**Cristian Camilo Álvarez Correa**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrícolas y Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A Isidro Elías Suárez Padrón, Ph. D. Director tesis de grado. Por brindarme su asesoría y recomendaciones en el transcurso de mi proyecto, por ser un docente ejemplar en el ámbito investigativo y por desempeñar su rol como Director de la mejor manera.

A Carmen Polo Tordecilla, auxiliar laboratorio de Biotecnología vegetal, por brindar su ayuda y conocimiento técnico.

A Claudia López Díaz por su asesoría en aspectos de investigación.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	14
INTRODUCCIÓN.....	18
1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. MARCO TEÓRICO.....	24
3.1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	24
3.1.1. Antecedentes.....	24
3.2. Naranja valencia (Citrus sinensis (L.) Osbeck.): Origen y distribución geográfica.....	26
3.3. Clasificación taxonómica y botánica.....	26
3.4. Importancia económica.....	27
3.5. Germinación de semillas.....	28
3.6. Propagación.....	30
3.7. Yemas.....	32
3.8. Mini injerto.....	33
4. OBJETIVOS.....	35
4.1. GENERAL.....	35
4.2. ESPECÍFICOS.....	35
5. HIPÓTESIS.....	36
6. METODOLOGÍA.....	37
6.1. LOCALIZACIÓN.....	37
6.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	37
6.2.1. Material vegetal.....	37
6.2.2. Producción de patrones y crecimiento.....	37
6.2.3. Inducción de yemas.....	38
6.2.4. Mini injertos.....	39
6.2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	41
7.1. PRODUCCIÓN DE PATRONES Y CRECIMIENTO.....	41
7.1.1. Porcentaje de germinación.....	41
7.1.2. Número de plantas producidas.....	43
7.1.3. Tiempo de germinación.....	44



7.2. Inducción de yemas en plantas madres.....	45
7.2.1. Número de brotes.....	45
7.2.2. Longitud y grosor de yemas.....	46
7.3. Mini injertos.....	49
7.3.1. Porcentaje de supervivencia de mini injertos.....	49
7.3.2. Longitud de yemas y número de hojas.....	58
8. CONCLUSIONES.....	62
9. BIBLIOGRAFÍA.....	63
10. ANEXOS.....	75

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Datos generales de prueba de germinación de semillas de Mandarina cleopatra ( <i>Citrus reshni</i> Hort ex Tan) .....	<b>41</b>
<b>Tabla 2.</b> Tiempo de germinación de semillas con cuatro tratamientos(Escarificadas + GA <sub>3</sub> , Sin escarificar + GA <sub>3</sub> , Escarificadas y Sin escarificar).....	<b>45</b>
<b>Tabla 3.</b> Número de nuevas yemas en plantas adultas de Naranja Valencia ( <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck.) sometidas a la técnica de poda y tratadas con 1 mg. L <sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP).....	<b>46</b>
<b>Tabla 4.</b> Datos generales de mini injertos en plantas de Naranja Valencia ( <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck.).....	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Comparación de cuatro tratamientos <b>T1</b> (Semillas escarificadas), <b>T2</b> (sin escarificar), <b>T3</b> (Escarificadas + 1mg. L <sup>-1</sup> de GA <sub>3</sub> ) y <b>T4</b> (Sin escarificar + 1mg. L <sup>-1</sup> de GA <sub>3</sub> ), en prueba de germinación de semillas de Mandarina Cleopatra ( <i>Citrus reshni</i> Hort ex Tan).....	42
<b>Figura 2.</b> Respuesta de longitud de yemas (cm) a la realización de podas y la aplicación de 1mg.L <sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP) en plantas de Naranja Valencia ( <i>Citrus sinensis</i> (L.)).....	477
<b>Figura 3.</b> Respuesta de grosor de yemas (cm) a la realización de podas y la aplicación de 1mg.L <sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP) en plantas de Naranja Valencia ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) osbeck). ....	499
<b>Figura 4.</b> Diferentes técnicas de mini injertación en plantas de naranja valencia ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) osbeck) .....	50
<b>Figura 5.</b> Mini injerto con el método hendidura, con buenas características fenotípicas de Naranja valencia ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.).....	51
<b>Figura 6.</b> Yema en contacto con cambiums vasculares del patrón de mandarina cleopatra ( <i>Citrus reshni</i> Hort ex Tan) .....	51
<b>Figura 7.</b> Crecimiento y desarrollo de yemas de mini injertos con el método hendidura.....	522
<b>Figura 8.</b> Crecimiento y desarrollo de yemas de mini injertos con el método T-invertida ( <i>Miniescudete</i> ).....	533
<b>Figura 9.</b> Mini injerto del método T- invertida ( <i>Miniescudete</i> ) sometido a la técnica de agobio. ....	533
<b>Figura 10.</b> Mini injertos del método Hendidura fijados con Parafilm®.....	¡Error!

Marcador no definido.5

**Figura 11.** Mini injertos exitosos del método T-invertida (*Miniescudete*). .....¡Error!  
Marcador no definido.6

**Figura 12.** Mini injerto vigoroso del método T- invertida (*Miniescudete*). .....¡Error!  
Marcador no definido.7

**Figura 13.** Mini injerto fallido con el método yema terminal..¡Error! Marcador no  
definido.8

**Figura 14.** Yema apical deshidratada..... ¡Error! Marcador no definido.8

**Figura 15.** Longitud de yemas (cm) comparado en dos métodos de mini injertación  
(Hendidura y T-invertida (*Miniescudete*)).....59

**Figura 16.** Número de hojas comparado con dos métodos de mini injertación  
(Hendidura y T-invertida) .....60

## LISTA DE ANEXOS

**Pág.**

<b>Anexo 10.1.</b> Planta adulta de Naranja valencia de vivero comercial “FERJA DE FRUTALES” con Registro ICA: 25290-06V. ....	<b>755</b>
<b>Anexo 10.2.</b> Prueba estadística ANAVA en prueba de germinación de semillas de mandarina cleopatra ( <i>Citrus reshni</i> Hort ex Tan) .....	<b>75</b>
<b>Anexo 10.3.</b> Prueba de Tukey (HSD) para prueba de germinación en semillas de mandarina cleopatra ( <i>Citrus reshni</i> Hort ex Tan).....	<b>76</b>
<b>Anexo 10.4</b> Datos de prueba de germinación de semillas de mandarina ( <i>Citrus reshni</i> Hort ex Tan). ....	<b>757</b>
<b>Anexo 10.5.</b> * Prueba t de Student para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) para las variables longitud y grosor de yemas (cm).....	<b>757</b>
<b>Anexo 10. 6.</b> * Prueba t de Student para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) para la variabe longitud de yemas (cm). ....	<b>788</b>
<b>Anexo 10.7.</b> * Prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) para la variable número de hojas.....	<b>788</b>

## RESUMEN

La Naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) es la más cultivada en las regiones citrícolas del mundo al igual que en Colombia, siendo las regiones subtropicales las responsables de más del 85% de la producción mundial. La Naranja Valencia es de gran importancia en Córdoba debido a su amplio consumo y además por sus altos contenidos nutricionales como la vitamina C, que ayuda a absorber otros nutrientes. En Colombia los pequeños productores de plantas para siembra del área citrícola, tienen la incapacidad de cumplir lo requerido por la Resolución 12816 de 2019, principalmente por los costos que implica el mantener plantas madres de gran tamaño bajo condiciones de casa malla. La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba, municipio de Montería en el departamento de Córdoba y tuvo como objetivo principal evaluar la eficiencia de tres técnicas de mini injertación en la producción de plantas de naranja valencia. Los patrones fueron obtenidos a partir de semillas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan) evaluando diferentes condiciones para la germinación. Las semillas que fueron escarificadas alcanzaron el mejor resultado con un 100% de germinación. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ( $P < 0,05$ ). Los patrones y las plantas productoras de yemas fueron mantenidas en casa malla con riego por aspersión y tratamiento fitosanitario preventivo. Para la inducción de yemas, se obtuvo mayor número de brotes cuando las plantas madres fueron podadas, observándose 27 nuevas yemas al cabo de cuatro semanas, no se observaron diferencias significativas en las variables evaluadas ( $P > 0,05$ ). Se evaluaron tres métodos de mini injertos (T invertida, hendidura y yema terminal) con 20 repeticiones para cada tratamiento, el método Hendidura obtuvo el mayor porcentaje de mini injertos exitosos (75%), seguido del método T invertida (37,2%), el método que obtuvo los datos menos favorables fue yema terminal (0%). Se evaluó la longitud de la yema (cm) y número de hojas. La longitud de yemas se analizó con una Prueba t de Student para muestras

independientes, donde no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), para el número de hojas se utilizó una Prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras independientes. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), con 3 y 5 hojas promedio.

***Palabras claves:*** Naranja valencia, cítricos, propagación, mini injertos, semillas.

## ABSTRACT

The Valencia Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) is the most cultivated in the citrus regions of the world as well as in Colombia, being the subtropical regions responsible for more than 85% of the world production. The Valencia Orange is of great importance in Cordoba due to its wide consumption and also because of its high nutritional content such as vitamin C, which helps to absorb other nutrients. In Colombia, small producers of plants for planting in the citrus area are unable to comply with the requirements of Resolution 12816 of 2019, mainly because of the costs involved in maintaining large mother plants under net house conditions. This research was carried out in the Laboratory of Vegetal Biotechnology of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Cordoba, municipality of Montería in the department of Cordoba, and its main objective was to evaluate the efficiency of three mini-grafting techniques in the production of orange Valencia plants. The rootstocks were obtained from cleopatra mandarin seeds (*Citrus reshni* Hort ex Tan) evaluating different conditions for germination. The seeds that were scarified achieved the best result with 100% germination. There were statistically significant differences between the evaluated treatments ( $P < 0.05$ ). The rootstocks and the plants producing buds were kept in a net house with spray irrigation and preventive phytosanitary treatment. For bud induction, it was obtained a greater number of sprouts when the mother plants were pruned, observing 27 new buds after four weeks, there were not significant differences in the variables evaluated ( $P > 0.05$ ). Three mini-graft methods were evaluated (inverted T, cleft and terminal bud) with 20 repetitions for each treatment, the cleft method obtained the highest percentage of successful mini-grafts (75%), followed by the inverted T method (37.2%), the method that obtained the less favorable data was terminal bud (0%). Bud length (cm) and number of leaves were evaluated. Bud length was analyzed with a Student t-Test for independent samples, where no significant differences were observed ( $P > 0.05$ ), for number of leaves a non-parametric Wilcoxon Test for independent samples was used. Significant differences between treatments were observed ( $P < 0.05$ ), with 3



and 5 leaves on average.

**Keywords:** Orange valencia, citrus, propagation, mini grafts, seeds.

## INTRODUCCIÓN

El origen del género *Citrus* se sitúa en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago Indomalayo hasta Nueva Guinea. Las primeras variedades e híbridas de cítricos fueron el resultado de un largo proceso de identificación, colecta y reproducción de plantas silvestres (Earth, 2004). Los cítricos se encuentran entre los grupos de plantas más importantes del mundo, tienen una larga historia de cultivo que supera los 4000 años (Li *et al.* 2010).

En Colombia, los cítricos se cultivan desde el nivel del mar hasta los 2.100 msnm; el mejor comportamiento comercial se logra entre los 1.500 y los 1.600 msnm. Las temperaturas óptimas están entre los 18 y 30 °C. Así, las variedades tempranas provenientes de las regiones subtropicales se adaptan a los climas medios, y las variedades tardías a los cálidos. Esto indica que la selección de variedades (copas) y patrones debe realizarse con base en sus requerimientos climáticos y edáficos, preferiblemente con evaluaciones realizadas en condiciones ambientales cercanas a los sitios de cultivo (Hernández, D., y Rodríguez, J. (2014).

La naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), es originaria de China, pero fue identificada en Portugal antes de 1865; es clasificada como de cosecha tardía en el subtrópico (Agropecuaria, 2016). La Naranja valencia fue traída a América desde Portugal (Amórtegui *et al.* 2001). Es la variedad de naranja dulce más cultivada en las regiones citrícolas del mundo al igual que en Colombia. Las principales regiones productoras de cítricos en el mundo están ubicadas entre los 20° y 40° de latitud N y S lo que se conoce como los cinturones citrícolas. En el caso de la naranja, en las regiones subtropicales se produce más del 85% de la producción mundial, siendo los principales productores, Brasil (29%), Estados Unidos (11%), México (7%), India (6%) y China (5%); Indonesia, España, Irán e Italia suman el 4% del total (FAO, 2009). Esta especie pertenece a la familia Rutaceae, a la clase Angiospermae, subclase dicotiledónea, al orden Rurales y al género *citrus*. Son árboles pequeños con hojas unifoliadas, pecíolos con pequeñas alas y articulados con la vaina de la hoja; las flores son de color blanca, simples y ubicadas en las axilas de las hojas,

ovario generalmente de 10 a 14 partes; el fruto es un tipo especial de baya (hesperidio), las semillas pueden ser monoembríonicas y poliembríonicas; la raíz pivotante con muchas raíces secundarias (Earth, 2004).

## 1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La producción y consumo mundial de cítricos ha pasado por un período de enorme crecimiento, a partir de la segunda mitad de los años 80. La producción de naranjas, tangerinas, limones y limas se ha expandido rápidamente. Niveles más altos de producción han permitido a su vez mayores niveles de consumo total (CORPOICA 2012). Según el ICA (2019), declaró la enfermedad Huanglongbing (HLB) de los cítricos y su vector el insecto *Diaphorina citri* Kuwayama, como plagas de control oficial, y se establecen las medidas fitosanitarias para su vigilancia y manejo. El HLB es la enfermedad más devastadora para la industria citrícola en el mundo, que ocasiona la reducción masiva en la producción de frutas y la muerte de árboles infectados.

Para la producción de plantas cítricas de buena calidad en viveros, los costos de producción suelen ser altos, por tal motivo los pequeños productores presentan incapacidad para cumplir con los requisitos específicos de la Resolución 12816 de 2019 propuesta por el ICA, lo que ha ocasionado que éstos pequeños productores no se acojan a la presente Resolución y por lo tanto, no produzcan plantas cítricas. Según Carvalho *et al.* (2005) la planta de vivero es uno de los insumos más importantes para la formación de una plantación de cítricos, teniendo en cuenta el carácter perenne del cultivo. La importancia de la planta de vivero radica en el hecho de que el potencial máximo de producción y de calidad de las frutas será revelado entre 6 y 8 años después de plantada, y la longevidad de la plantación solamente se sabrá en un intervalo de tiempo aún mayor (Teófilo, 1991). De la misma forma que una planta de vivero de buena calidad constituye una de las principales bases de la citricultura, una planta de vivero de baja calidad puede originar una plantación improductiva y hacer inviable un negocio lucrativo. Por lo anterior se está buscando un método de producción de plantas injertadas que no involucre costos muy altos. Debido al bajo presupuesto económico de los productores y la técnica para mantener plantas cítricas adultas bajo condiciones de casa malla, las cuales son las productoras de yemas, esto representa una gran problemática para los viveros

convencionales, por lo cual se buscan alternativas factibles que permitan solucionar ésta problemática. Una de las técnicas es utilizar tanto yemas, como patrones de menor tamaño a través del método de mini injerto, esperando resultados favorables que permitirán utilizar plantas donadoras de yemas y productoras de patrones que pueden ser ubicados en recipientes que varíen en tamaño, con el fin de viabilizar el mantenimiento de éstas en lugares de propagación, cumpliendo de esta forma las restricciones establecidas por la Resolución 12816 de 2019.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La citricultura colombiana ha venido creciendo en los últimos seis años, mostrando incrementos en área sembrada del 5.8% y producción en 4.5%, por encima del sector agropecuario en general (ICA 2018). Los cítricos se propagan a través del injerto, ya que el patrón proporciona muchas características favorables para los cítricos cuando se trata de la calidad de las frutas, la tolerancia y la resistencia al clima y las adversidades fitopatológicas (Andrade *et al.* 2003). Los cítricos presentan una gran oportunidad de generación de empleo por ser cultivos que exigen mano de obra permanente. En el año 2016, las exportaciones de naranjas a nivel mundial, representaron el 45% de la producción (Ministerio de Agricultura, 2019). Lo cual indica un alto consumo interno en los países productores, al igual que de procesamiento de las frutas para el mercado nacional e internacional (Espinal *et al.*, 2005). El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2019), reporta que la cadena citrícola generó 199.828 empleos indirectos y 299.742 directos para un total de 499.570 empleos con un área sembrada de 99.914 en 2019, 2 empleos directos y 3 empleos indirectos. ha<sup>-1</sup>, cuando es época de cosecha los empleos indirectos se duplican.

Las regiones productoras de cítricos en Colombia se encuentran en una etapa muy incipiente de desarrollo que limita la posibilidad de competir con otros países en América Latina. El país posee condiciones propicias para el establecimiento de una industria competitiva, pero tiene una limitada capacidad de generación de volumen constante, de ofrecer las variedades requeridas por el mercado y de brindar una oferta de fruta con calidad. Por el contrario, el desarrollo, evolución y crecimiento del mercado interno colombiano está permitiendo que la oferta citrícola de países vecinos vea a Colombia como un importante mercado de destino para su producción exportadora (CORPOICA 2012).

En Colombia actualmente existe la Resolución 12816 del 21 de agosto de 2019 que rige la producción de plantas comerciales de cítricos, la cual establece que las plantas proveedoras de yemas y los injertos producidos para su comercialización,

deben permanecer bajo condiciones controladas en las llamadas “casa malla”, esto con el fin de prevenir la presencia de insectos vectores de enfermedades, que pueden afectar la producción del material de propagación. Debido a la incapacidad de algunos viveros de cumplir con la Resolución 12816 de 2019, han salido del mercado citrícola, lo que ha ocasionado un impacto en la economía de los productores de plantas de vivero. En el presente estudio se evaluó la eficacia de diferentes métodos de mini injertación tomando como fuente de yemas plantas injertadas de vivero de tamaño reducido y patrones en estados tempranos de crecimiento, como alternativa para el manejo del proceso de producción de plantas cítricas por grandes, medianos y pequeños productores para seguir produciendo plantas cítricas injertadas y contar con material de siembra producido y adaptado a las condiciones locales.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. REVISIÓN DE LITERATURA

##### 3.1.1. Antecedentes

Varios autores reportan el crecimiento vegetativo y supervivencia de los cultivares de cítricos utilizados con diferentes patrones, a través del método de mini injerto, para generar plantas idénticas a sus padres. Mendes *et al.*, (2019), realizaron mini injertos, utilizando segmentos apicales (1 y 2 cm de largo) de mandarina "Clementina", con patrones de Citrandarinas 'Indio' y 'Riverside' y de la combinación entre variedades 'Pera' dulce naranja, mandarina "Sunki Madarin" y limón "Santa Cruz Rangpur". Se usaron los patrones de procedimiento de mini injertos (20 y 30 cm de alto y un diámetro de aproximadamente 2 mm) en ambos experimentos. Estos fueron sometidos a decapitación en el área apical y a defoliación; quedando tres hojas superiores en cada planta. Se abrió una ranura longitudinal en el tallo (aproximadamente 0,5 cm de profundidad); posteriormente, se realizaron los mini injertos. Se hicieron dos cortes en forma de cuña sobre la base del segmento apical, que se insertó en la ranura longitudinal del patrón. Para facilitar la adherencia y evitar la deshidratación del tejido, las partes en contacto entre sí, se sellaron con Parafilm® para cubrir completamente el área del injerto. Las plantas injertadas se cubrieron con bolsas de plástico transparentes, que se etiquetaron sobre la base del patrón para formar una cámara húmeda. Las plantas se almacenaron a temperatura media  $\pm 27^{\circ} \text{C}$ . El Parafilm® se mantuvo hasta que ambas partes se adhirieron por completo, 60 días después, en promedio. Se eliminaron las yemas en los patrones para evitar desequilibrios nutricionales capaces de influir en las yemas de los patrones.

Según las condiciones experimentales que se evaluaron, las tasas de supervivencia de diferentes patrones fueron similares: 32.50% y 35%, respectivamente, para las Citrandarinas ran Indio 'y' "Riverside". No presentaron diferencia entre los genotipos



evaluados. Con respecto a la variación en el tamaño del segmento apical, la tasa de supervivencia más alta se observó cuando se usó una longitud del segmento apical de 2 cm (55%).

En otra especie como Maracuyá (*Pasiflora edulis* Sims) se realizaron cortes de cuña de lados iguales en la base del injerto (punta de las ramas adultas de *P. edulis* f. Flavicarpa) que se introdujeron en la división del patrón. Para mantener el injerto y patrón estrechamente atados, se utilizaron clips o Parafilm®. Las plantas injertadas se acondicionaron y mantuvieron durante 10 días en bolsas de plástico (7 x 15 cm) para crear un ambiente húmedo y reducir la deshidratación del injerto. El experimento se mantuvo en un invernadero con riego por microaspersión, administrando a cuatro riegos de tres minutos por día en intervalos de tres horas. El diámetro del injerto (DI, mm) y del patrón (DP, mm), se evaluaron con la ayuda de un calibrador digital sobre y debajo del área del injerto, respectivamente, después de 21 días después del mini-injerto (DDM). Donde la unión fue favorecida por patrones con brotes de 8-12 cm (90.27%), en comparación con los de 3-7 cm (65.96%) (Segantini *et al.*, 2016).

Navarro (1979) (Como se citó en Mendoza, 2004), a través de métodos de mini-injertación en condiciones *in vitro*, realizando en cítrico (agrio) ensayando varios métodos de colocación (injerto) del ápice sobre el patrón. En unos casos el ápice se colocó en la superficie de corte del epicotilo decapitado, mientras que en otros se introdujo en una incisión tipo T-invertida. Esta incisión se realizó mediante dos cortes perpendiculares de 1 mm de longitud en la corteza del patrón sin alcanzar la médula. La incisión se realizó en el punto de decapitación del epicotilo y también se realizaron cortes en otra región entre 3-5 mm de altura del epicotilo. Cuando el mini-injerto se realizó en la superficie de corte del epicotilo, el ápice se colocó en contacto con la corteza, el anillo vascular o la médula. Cuando se utilizó la incisión, el ápice se colocó con su superficie basal de corte en contacto con la superficie de corteza del patrón expuesta por el corte horizontal de la incisión o en contacto con la región cambial. En esta última posición el ápice estaba orientado perpendicularmente al eje vertical del patrón, de forma análoga al método standard de injerto en los viveros.

Mendoza *et al.*, (2004), evaluó microinjertos en la especie Folha murcha (*Citrus sinensis* (L.)), con patrones de aproximadamente dos semanas de edad, los cuales se decapitaron a una altura de 2 cm. Se utilizaron ápices caulinares, los cuales fueron insertados en una incisión tipo T invertida en el patrón.

### **3.2. Naranja valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.): Origen y distribución geográfica.**

La naranja del cultivar Valencia (*Citrus sinensis* L.), Osbeck se originó en la China, pero fue identificada en Portugal antes de 1865; es clasificada como de cosecha tardía en el subtrópico (Agropecuaria, 2016). La naranja dulce es la variedad más cultivada en las regiones citrícolas del mundo, al igual que en Colombia. Siendo las regiones subtropicales las responsables de más del 85% de la producción mundial; los principales países productores son Brasil, Estados Unidos, México, India y China (Orduz y Garzón, 2012).

Los cítricos son cultivados en más de 140 países alrededor del mundo, localizándose la mayoría entre los 35° N y 35° S alrededor del ecuador, especialmente en el hemisferio norte (Liu *et al.* 2012); aunque, los mayores centros de diversidad de estas especies de plantas pertenecientes a la familia Rutaceae se encuentran en el sur de África y Australia (Bayer *et al.* 2009).

### **3.3. Clasificación taxonómica y botánica.**

Los cítricos son una especie que pertenece a la clase Angiospermae, subclase dicotiledónea, al orden rutae, a la familia Rutaceae y al género *Citrus*. Existen 145 especies de cítricos y entre ellos la naranja. El género *Citrus*, pertenece a la gran familia de las Rutáceas, tiene 16 especies y está constituida por dos sub-géneros: Papeda y Eucitrus. Entre las principales especies del género *Citrus* se encuentran: *Citrus sinensis* (Naranja dulce), *Citrus aurantium* (naranja agria), *Citrus reticulata*

(Mandarina), *Citrus aurantifolia* (Limón criollo), etc. Son árboles pequeños, hojas unifoliadas, pecíolos con pequeñas alas y articulados con la vaina de la hoja; las flores son de color blanca, simples y ubicadas en las axilas de las hojas, ovario generalmente de 10 a 14 partes; el fruto es un tipo especial de baya (hesperidio), las semillas pueden ser monoembríonicas y poliembríonicas; la raíz pivotante con muchas raíces secundarias (Earth, 2004).

### **3.4. Importancia económica.**

Colombia reporta 104.367 has en cítricos distribuidos en todo el territorio nacional (ICA, 2019). Según la Encuesta Nacional Agropecuaria, ENA (DANE, 2016), durante el año 2015 en Colombia se contaba con 44.420 ha sembradas de naranja, de las cuales se encontraban en producción 32.610 ha, de las que se cosecharon 497.226 ton de fruta, con rendimientos promedios de 15,2 ton ha<sup>-1</sup> al año; siendo el departamento de Antioquia, el principal productor con 271.637 ton, seguido por los departamentos de Quindío, Valle del Cauca y Meta. La variedad de naranja se diferencia según el uso dado, es decir si es para consumo fresco o para congelar. Aunque la mayoría de las frutas cítricas se pueden consumir en forma fresca, la mayor parte de la producción es destinada a la producción de jugo, y de esto la mayoría corresponde a jugo de naranja. La producción mundial total aproximada en el año 2014 fue de 121.273 millones ton, de las cuales el 50% correspondieron a naranjas, 25% a mandarinas, 10% a limones y limas el 1% a pomelos y el resto a las otras frutas cítricas. En Córdoba se estima que hay 459 ha de cítricos sembradas, mayoritariamente de naranja dulce, y una producción anual de 7.963 ton ha<sup>-1</sup> (Minagricultura, 2017). Asimismo, de acuerdo con el ICA, en el departamento de Córdoba en el año 2012 se encontraban registrados 11 viveros que producían y/o comercializaban plantas cítricas. Córdoba cuenta con 41 viveros con registro ICA, pero ninguno cumple con la Resolución 12816 de 2019 para producir y comercializar plantas cítricas. (ICA 2020). En la base de datos actual del ICA solo aparece un vivero registrado como productor y/o comercializador de cítricos para el

año 2017 (ICA 2017). Sin embargo, Colombia cuenta con 1385 viveros registrados ante el ICA de los cuales 65 cumplen con la Resolución 12816 de 2019 lo que equivale al 4,7% de los viveros. Esto indica que las siembras de nuevas plantaciones de cítricos en Córdoba y zonas aledañas se están haciendo con materiales de siembra introducidos de otras zonas del país, con los consecuentes problemas de adaptación del material a esta zona. Igualmente se convierte en un potencial de negocio Agrícola.

### **3.5. Germinación de semillas.**

La germinación de semillas es un proceso en el cual se generan cambios morfológicos y fisiológicos que terminan en el crecimiento del embrión (Miransari y Smith, 2014). La germinación requiere de condiciones específicas de temperatura, niveles de oxígeno y luz, con las proporciones adecuadas para cada especie (Corbineau *et al.*, 2014). La semilla absorbe agua, lo que resulta en expansión y elongación del embrión. Cuando la radícula crece fuera de la testa el proceso de germinación ha terminado (Hermann *et al.*, 2007). La germinación de semillas de Mandarina Cleopatra va a depender del tiempo de secado una vez hayan sido extraídas de los frutos y también del almacenamiento que son sometidas. Gravina (1989) y Sempionato (1997), afirman que después de la extracción de las semillas de cítricos se recomienda secarlas a la sombra a temperatura ambiente por tiempo variable; indican que se requieren de 24 a 36 horas. Sin embargo, Stenzel *et al.*, (1992) afirman que el tiempo de secado de semillas es de 24 a 48 horas, pero no señalan el contenido de humedad de la semilla, el porcentaje de germinación y emergencia después del almacenamiento. Según Cochran *et al.*, (1986); Cameron y Soost (1987) señalan que cuando las semillas se secan demasiado pierden viabilidad y capacidad de germinación. Es necesario saber la composición química de las semillas de cítricos, para su almacenamiento. Por lo tanto, Nieves *et al.* (1995) afirman que las semillas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan) están

constituidas por 34,7% de agua y 65,3% de materia seca; de éste, el 25,87% es grasa bruta; los carbohidratos contenidos son fructosa, sacarosa y almidón (5,66; 14,08 y 8,0 mg por gramo de materia seca). Siqueira *et al.* (2002) señalan que mandarina cleopatra ha presentado problemas de germinación relacionados con el almacenamiento inadecuado de las semillas. Observaron que las semillas con 18,4% de humedad, almacenadas a 5–7°C disminuyeron su germinación desde los 30 días llegando a 23% a los 60 días. Atribuyen este hecho a que el contenido de humedad disminuyó de 18,4% a 5% a los 30 días de almacenamiento.

Anderson *et al.*, (1996) afirman que la mayoría de las semillas cítricas son poliembriónicas. Ello significa que cada semilla tiene más de un embrión. Uno de ellos es de origen sexual y los otros son nucelares. Se denominan nucelares a los que se originan en el nucelo de la semilla, tejido que rodea al saco embrionario. Los plantines de este origen tienen las mismas características de las plantas madre de donde se sacó la semilla.

Por otro lado, es importante la escarificación de semillas de cítricos para su germinación, la cual consiste en raspar, quebrar, eliminar o perforar las testas de las semillas, ya sea manualmente o con instrumentos. La escarificación manual está considerada como el método que da los mejores resultados en semillas de muchas especies (Bonner, 1974). La escarificación mecánica de semillas no requiere de control de temperatura, implica pocos riesgos para los operarios y las semillas quedan secas; sus desventajas radican en que las semillas escarificadas son más susceptibles al ataque de patógenos (Hartmann y Kester, 1997).

El uso de reguladores como las giberelinas, ha demostrado incrementar el porcentaje de germinación, la velocidad de emergencia y crecimiento inicial de la plántula (Villagran, 1999). Algunos ensayos hechos con giberelinas demuestran que estas ayudan en forma considerable en la germinación de semillas de frutales, por ejemplo, en cítricos (FAO, 1991), reportan que aumentaron el porcentaje y velocidad de germinación con remojo en giberelinas. Duarte *et al.* (1974) en semillas de chirimoya, muestra claramente los beneficios del GA<sub>3</sub> en incrementar la

germinación.

### **3.6. Propagación.**

Los cítricos se propagan de forma natural por métodos sexuales. Las semillas están compuestas por una cubierta fibrosa, dos cotiledones y uno o varios embriones que pueden dar origen a varias plántulas en el proceso de germinación. Las semillas se extraen de frutos maduros fisiológicamente, los cuales se lavan con agua fresca y se secan a la sombra. Con el fin de prevenir el ataque de hongos, se puede aplicar un fungicida protectante. El almacenamiento debe realizarse en condiciones de reducida humedad, aunque las semillas de cítricos se comportan como recalcitrantes, bajo buenas condiciones de almacenamiento (baja humedad relativa y baja temperatura) su viabilidad se puede conservar hasta por 6-12 meses. Las semillas pueden sembrarse enteras o escarificadas, aunque la escarificación agiliza el proceso de germinación y emergencia. La germinación ocurre dentro de la primera semana para la mayoría de las semillas, pero puede extenderse hasta por dos semanas de acuerdo con el vigor de la semilla. Una vez germinadas, las plantas destinadas a ser patrones son mantenidas en condiciones de vivero como mínimo por 6 meses y hasta por un año para su injertación (Hartmann *et al.*, 2013). Las plantas cultivadas en viveros proporcionan una mayor eficiencia de las actividades de gestión para el riego, la nutrición y el control de plagas y enfermedades, así como mayor calidad de los propágulos vegetativos (Xavier *et al.*, 2003).

Si se considera que una planta de vivero de buena calidad es una de las bases de la citricultura, una planta de vivero de baja calidad puede originar una plantación improductiva (Dibbern, 2009). La injertación es una técnica muy antigua de propagación vegetal, existen evidencias que prueban que era utilizada por los chinos en el 1000 a. C. Presumiblemente, el hombre haya tomado la idea a partir de la observación de los injertos que se producían naturalmente entre las ramas de los árboles al frotarse las cortezas entre sí por acción de distintos elementos, como por ejemplo el viento, y quedar expuestos los tejidos específicos que, con el tiempo,

generaban una fuerte unión. Si bien a menudo, estos dos términos son utilizados indistintamente para referirse a la propagación de los vegetales, sus significados son diferentes y es conveniente emplearlos en su correcta acepción. Se reproduce un frutal cuando se emplea la vía sexual (semillas) y se multiplica cuando se utiliza la vía asexual (yemas, estacas, etc.).

La reproducción es el medio natural por el que se propagan las plantas, asegurando la perpetuación de las especies; por el contrario, la multiplicación es el medio artificial, creado por el hombre, que permite, fundamentalmente, conservar las características de una variedad, originalmente obtenida por vía sexual o por mutaciones, que no se perpetúan fielmente por semillas. Entre los métodos empleados para la multiplicación de frutales, la injertación es, sin duda alguna, uno de los procedimientos utilizados con mayor frecuencia, que ofrece enormes ventajas sobre otros métodos de propagación asexual como, la multiplicación por estaca (Valentini y Arroyo, 2003).

La unión estable de un injerto va a depender de varios factores, entre los cuales se destacan la compatibilidad de las partes (patrón y yema), la presencia de enfermedades y la habilidad del injertador, entre otras. La primera es una condición que está influenciada por aspectos de tipo genético y fisiológico. Entre más cercanas sistemáticamente son las partes del injerto mayores son las probabilidades de ser compatibles, mientras que a medida que se aumenta la distancia taxonómica es menos probable lograr una unión estable; de igual forma, la unión de injerto inicia a partir del contacto íntimo de las zonas cambiales del patrón y la yema, una condición que solo puede lograrse en plantas dicotiledóneas que se encuentren en buenas condiciones de hidratación y nutrición para tener una zona de cambium vascular activa. En cuanto a las enfermedades, algunos microbios actúan en la zona del injerto y puede provocar la falla de este; el caso más conocido es del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), el cual provoca la muerte progresiva e irreversible de la planta afectada (Naz *et al.* 2007). El tercer aspecto es la habilidad del injertador, el cual hace referencia a la maestría con la cual se hacen los cortes,

la sanidad que se aplique a la operación y la colocación de las dos partes de tal forma que se establezca un contacto íntimo de las zonas cambiales, se evite la presencia de los contaminantes en la zona injertada y se mantengan las partes unidas hasta que haya una cicatrización y formación vascular continua entre el patrón y la yema (Hartmann *et al.* 2013).

### **3.7. Yemas.**

El inicio de la brotación, el desarrollo de la yema, requiere de la activación de la división celular en el corpus. Los primordios foliares y la diferenciación de yemas axilares se produce a medida que el meristemo apical progresa. Inicialmente, las trazas de procambium son comunes para los órganos en desarrollo. La diferenciación de elementos vasculares, protoxilema y protofloema, progresa en sentido acrópeto y basípeto a partir del tercer primordio foliar (Agustí, 2003). La división celular requiere el aporte de carbohidratos para satisfacer los requerimientos energéticos, de ahí la dependencia nutricional de la brotación (Martínez *et al.*, 2015). Pero la brotación también depende de factores hormonales. El balance entre auxinas, citocininas y giberelinas determina que en el meristemo se promueva la diferenciación o la división (Moubayidin *et al.*, 2010). Las fitohormonas también regulan la inhibición de la brotación axilar mediante los procesos de dominancia apical (Bangerth *et al.*, 2000).

Por otra parte, las citoquininas, que son producidas mayoritariamente en las raíces, también se sintetizan en los brotes, y transportadas acrópetamente en el xilema, promueven el crecimiento de las yemas laterales. La brotación está controlada por la relación de auxinas/citoquininas. Una aplicación directa de citoquininas a las yemas axilares, en algunas especies, estimula la actividad de división celular y el crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006). Si la síntesis de citoquininas no se produce, la brotación de las yemas se inhibe (Ferguson y Beveridge., 2009).



La citoquinina BAP es importante para inducir la producción de yemas. Las citocininas juegan un papel relevante en el cultivo de tejidos vegetales, especialmente en la inducción de la división celular y el control de la morfogénesis, ya que, las citoquininas ayudan a incrementar la síntesis de proteínas. George (1993) menciona que concentraciones muy altas de citoquininas pueden causar la producción de una gran cantidad de brotes pequeños, que usualmente no se alargan y que en algunas especies presentan una forma, inusual llegando a ser hiperhídricos.

### **3.8. Mini injerto.**

La necesidad de modernizar la producción de plantas, especialmente en los cultivos frutales, ha sido estimulada por tendencias como el incremento de las densidades de siembra, la agricultura de precisión, la siembra de plantas con tamaños reducidos, la presencia creciente de plagas y enfermedades de importancia económica y también las regulaciones legales para la producción de plantas (Rehman y Gill, 2015). La propagación de plantas por injerto no ha sido exenta a estas modificaciones y cada día se buscan alternativas para realizar injertos que puedan utilizar patrones de menor tamaño y yemas consecuentemente con menores grados de desarrollo. El mini injerto consiste en la injertación que se realiza de yemas de tamaño reducido (< 1 cm de longitud) en patrones recién germinados o en estados iniciales de crecimiento y desarrollo. En este método se utilizan plantas mantenidas en condiciones de casa malla como donadoras de yemas y los patrones se germinan *in vitro* o *ex vitro*, pero el injerto se realiza en condiciones *ex vitro* al interior de una casa malla.

El mini injerto, se ha utilizado en algunas especies nuevas, como los árboles de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (Lemos *et al.*, 1994), la Caoba sudamericana (*Swietenia macrophylla* King) (Kalil *et al.*, 2001), *Prosopis alba* Griseb. (Ewens y Felker, 2003), Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) (Wendling y Hoffmann, 2005), Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. y *P. mucronata*

Lam.) (Alexandre *et al.*, 2013; Oliari *et al.*, 2016), Nuez (*Juglans regia* L.) (Farsi *et al.*, 2016) y Guayaba (*Psidium guajava* L.) (Campos *et al.*, 2017), como una nueva estrategia de propagación vegetativa. Además de promover la propagación clonal a gran escala de plántulas fitosanitarias de alta calidad, esta técnica tiene la gran ventaja de reducir la susceptibilidad de las plantas a las enfermedades del sistema, como sucede con la propagación a través del injerto convencional. Cuando esta técnica se compara con el microinjerto, presenta una mayor adherencia y excelentes tasas de curación, lo que facilita el injerto y la generación de plántulas en un período de tiempo más corto (Wendling y Hoffmann, 2005). Campos *et al.* (2017) afirman que el mini injerto puede acelerar el tiempo de producción de las plántulas de guayaba injertadas y aumentar su porcentaje de éxito del injerto.

Otros ejemplos de mini injertos se han realizado en aguacate al injertar brotes (3-6 mm) obtenidos *in vitro* a partir de embriones somáticos sobre patrones de los cultivares "Booth" y "Lula" de 3-4 semanas de germinada *in vitro* pero transferidos a condiciones de casa malla (Raharjo *et al.* 2003). En cítricos, se logró un 100% de efectividad cuando brotes de 5-10 mm de longitud regenerados *in vitro* fueron injertados en patrones decapitados a 7-12 cm de altura (De Pasquale *et al.* 1999).

Mendes *et al.*, (2019) en su investigación realizada en cítricos, afirman que el tamaño del segmento apical, también es un factor determinante para lograr un mini injerto exitoso, con uso de segmentos de 2 cm de largo facilita la adherencia de mini injertos con ápices caudales más pequeños. En este caso observaron los mayores porcentajes de supervivencia, los cuales se registraron en los patrones de citrandarina "Riverside" (60%) e "Indio" (50%), estos fueron mini injertados con segmentos de 2 cm de longitud. Las tasas de supervivencia se redujeron al 10% (citrandarina 'Riverside') y al 15% (citrandarina 'Indio') cuando se utilizaron segmentos de 1 cm de longitud.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. GENERAL**

- Evaluar la eficacia de los métodos de mini injertos Hendidura, T invertida y yema terminal en la propagación de plantas de Naranja valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.).

### **4.2. ESPECÍFICOS**

- Evaluar los efectos de los tratamientos de escarificación y Ácido Giberélico GA<sub>3</sub> para la germinación de semillas de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan) para la producción de patrones.
- Determinar los efectos de podas y Bencilaminopurina (BAP) sobre condiciones para inducir la producción de yemas, en plantas injertadas de Naranja valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.).
- Determinar el porcentaje de supervivencia en tres técnicas de mini injertación en plantas de Naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.).

## 5. HIPÓTESIS

La técnica de mini injertación Hendidura, es una alternativa para la producción y comercialización de plantas de vivero de la especie Naranja valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.).

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. LOCALIZACIÓN.**

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba, ubicado en el Municipio de Montería, departamento de Córdoba a una altura de 13 msnm. Sus coordenadas geográficas corresponden a los 8° 31' de Latitud Norte y 75° 58' Longitud Oeste, respecto al meridiano de Greenwich. Así mismo, cuenta con condiciones agroclimáticas que la clasifican como un Bosque Seco Tropical, según la clasificación de Holdridge, una temperatura promedio de 28°C, humedad relativa promedio del 80%, precipitación promedio anual de 1200 mm y brillo solar anual de 2108.2 horas (Palencia *et al.*, 2006).

### **6.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.**

#### **6.2.1. Material vegetal.**

El material vegetal para los patrones se obtuvo a partir de semillas de plantas adultas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan). Las yemas para los injertos se tomaron de plantas injertadas de aproximadamente un año de edad de Naranja Valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck.), las cuales fueron adquiridas en el municipio de Fusagasugá, departamento de Cundinamarca del vivero con autorización comercial de plantas cítricas “FERJA DE FRUTALES”, con Registro ICA: 25290-06V (Anexo 10.1).

#### **6.2.2. Producción de patrones y crecimiento.**

Las semillas de mandarina cleopatra se extrajeron de frutos en estado de madurez hortícola, fueron lavadas con agua potable para retirar el megasporangio, luego se

colocaron en un papel a la sombra durante el curso de la noche. Se establecieron cuatro tratamientos; donde se utilizaron aproximadamente 400 semillas. Para (T1) 100 semillas fueron escarificadas; para (T2) se utilizaron 100 semillas sin escarificar; (T3) consistió en tomar 100 semillas que fueron escarificadas y tratadas mediante inmersión de cinco minutos con una solución de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) y para (T4) 100 semillas fueron tratadas mediante inmersión de cinco minutos con una solución de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) sin escarificar. Posteriormente todas fueron colocadas de forma separada en una bandeja con papel humedecido y algodón con agua destilada estéril. Las bandejas se cubrieron para evitar la incidencia de luz y se colocaron a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$ . Cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente se repitieron tres veces. Para todos los tratamientos, se registró diariamente número de semillas germinadas, se calculó el porcentaje de germinación, el tiempo de germinación y el número de plantas producidas. Las semillas germinadas se trasplantaron en tubetes de 60 cc para su crecimiento.

### **6.2.3. Inducción de yemas.**

Las plantas injertadas de Naranja Valencia utilizadas como proveedoras de yemas fueron mantenidas en casa malla con riego por aspersión. Se trataron con  $2,5 \text{ ml. L}^{-1}$  de insecticidas sistémicos (Thiamethoxam) y  $1,25 \text{ ml.L}^{-1}$  de fungicida protectante (Azoxystrobin y Oxidicloruro (alternados)) cada 10 días. Un grupo de seis plantas fueron podadas mediante la remoción de las yemas terminales (4-5 cm del ápice) con el fin de inducir la producción de yemas axilares (T1). De forma alterna, otras seis plantas de la misma especie fueron tratadas con una aspersión de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Bencilaminopurina (BAP) (T2). Para ambos casos al cabo de 3-4 semanas se registraron las variables número de nuevos brotes producidos y las características de los mismos (Longitud y grosor (cm)).

#### **6.2.4. Mini injertos.**

Se evaluó la efectividad de tres métodos de mini injertación. En el primero, (T1) Yema terminal, consistió en decapitar el patrón a una altura de 5 cm y se colocó en la parte decapitada una yema (2 mm) en contacto con el cilindro radial; el injerto se cubrió con un tubo Eppendorf® (0,25 cc) durante 8 días. El segundo (T2) Hendidura, consistió en realizar un corte vertical en el centro del patrón decapitado (5 cm), en el cual se injertó la yema (1,5 cm) preparada para su ubicación, la parte injertada se fijó con Parafilm®, posterior a esto el mini injerto fue cubierto con un tubo Eppendorf (0,25 cc). El tercero, (T3) T invertida (Miniescudete), consistió en realizar un corte (5-10 cm de altura) en la corteza del patrón, finalizado con un corte perpendicular de 1 cm de longitud, y en éste se insertó la yema (5 mm) obtenida de las plantas injertadas, la zona se cubrió con Parafilm®, dejando el punto central de la yema sin cubrir. Cada método de injertación (tratamiento) se repitió 20 veces. Las plantas injertadas se mantuvieron en condiciones de casa malla (50% de retención de irradiación) con dos riegos diarios (1 minuto cada uno) por aspersión. Después de 6-8 semanas se registró el número de injertos exitosos y los datos de crecimiento (altura de la yema (cm)) y desarrollo (formación de nuevos órganos), fueron registrados semanalmente durante dos meses.

#### **6.2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

En el presente estudio los datos fueron analizados mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para producción y crecimiento de patrones; los datos de porcentaje de germinación fueron analizados mediante una Análisis de Varianza para un factor (ANAVA). Para inducción de yemas; los datos fueron analizados con una prueba t de Student para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) y para mini injertos; se utilizó la prueba estadística t de Student para muestras independientes con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) (Altura yemas (cm)), para el análisis de los datos número de hojas, los datos fueron distribuidos con el método estadístico no paramétrico Wilcoxon para muestras

independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ).



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1. PRODUCCIÓN DE PATRONES Y CRECIMIENTO.

#### 7.1.1. Porcentaje de germinación.

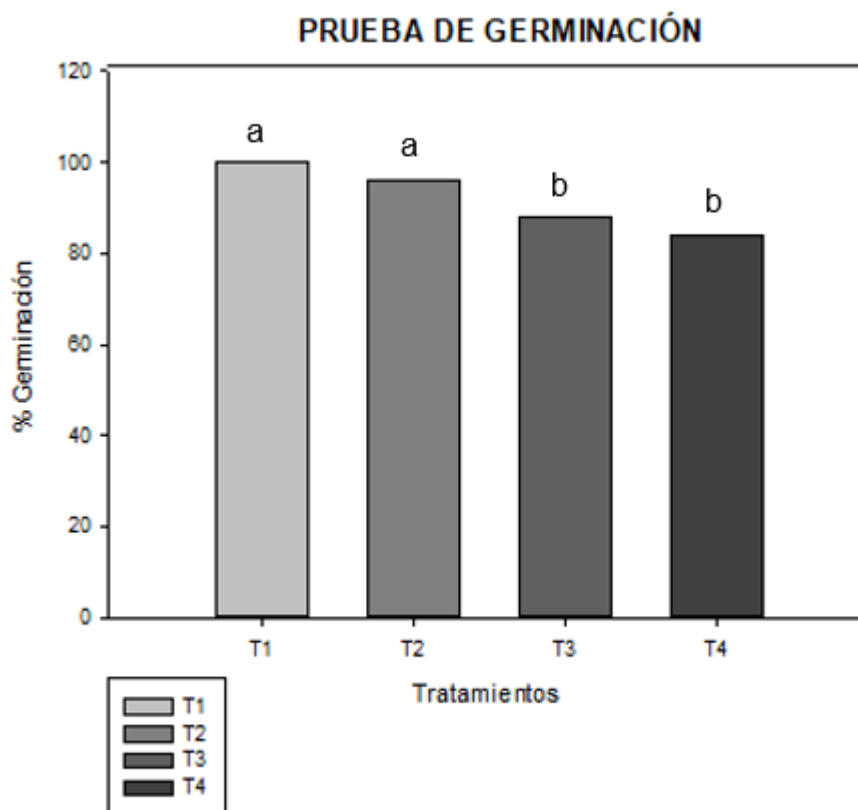
La tabla 1 muestra los resultados de la prueba de germinación. Se puede apreciar que el tratamiento que indujo el mayor porcentaje de germinación, fue el tratamiento T1 de semillas escarificadas, alcanzando de esta manera un 100% de germinación, seguido por el tratamiento T2 de semillas sin escarificar, con un 96% de germinación de semillas. Los tratamientos con menor porcentaje de germinación fueron los tratamientos T3 y T4 de semillas escarificadas + 1mg. L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> y semillas sin escarificar + 1mg. L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, con porcentajes de 88 y 84%, respectivamente.

El Análisis de Varianza (ANAVA) (Anexo 10.2), y la prueba de comparación de medias (Tukey) con un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$  (Anexo 10.3), permitió detectar diferencias estadísticamente significativas ( $P<0,05$ ) entre los tratamientos de semillas germinadas (Figura 1.).

**Tabla 1.** Datos generales de prueba de germinación de semillas de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan).

TRATAMIENTOS	% GERMINACIÓN	DÍAS DE GERMINACIÓN
T1: Escarificada	100	8
T2: Sin escarificar	96	7
T3: Escarificada + 1 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>	88	8
T4: Sin escarificar + 1 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>	84	8

**Figura 1.** Comparación de cuatro tratamientos **T1** (Semillas escarificadas), **T2** (sin escarificar), **T3** (Escarificadas + 1mg. L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>) y **T4** (Sin escarificar + 1mg. L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>), en prueba de germinación de semillas de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan). \*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ )).



Por lo anterior, en este estudio los cuatro tratamientos evaluados alcanzaron un alto porcentaje de germinación, ya que, las semillas una vez extraídas de los frutos, fueron secadas por un día y posteriormente utilizadas para su germinación. Villegas y Andrade (2005), obtuvieron porcentajes de germinación en semillas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan) de 90,6; 94,6 y 91,3%, donde hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Jaramillo *et al.*, (2012).

Determinaron las mejores condiciones de humedad para almacenar semillas, obtuvieron porcentajes de germinación en semillas de (Limón 'Volkameriana' (*Citrus volkameriana* Ten. y Pasq.) con porcentaje de 97,3%; Híbrido Sunki x English (*Citrus sunki* Hort. ex Tan. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), con porcentaje de 75,2% y Citrumelo CPB 4475 (*Citrus paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), con 47,8% de germinación, utilizados como patrones de Lima tahití (*Citrus lantifolia* Tanaka). Mas *et al.* (1995), (como se citó en Villegas y Andrade, 2005), obtuvieron 90% de germinación en semillas de mandarina 'Cleopatra' al almacenar las semillas durante seis meses a 4°C.

En este estudio, las semillas escarificadas, obtuvieron mejor respuesta en cuanto a la germinación, lo que concuerda con el estudio de Villagran (1999), donde encontró en semilla de canistel que los tratamientos que germinaron más rápido fueron aquellos donde se realizó escarificación, siendo el mejor el que no se le aplicó ácido giberélico con un 97,5% de germinación, también afirma que al escarificar las semillas tiene un efecto positivo en acelerar la germinación, y que al remojarlas en diferentes dosis de GA<sub>3</sub> realmente no ayudó a que produjera una germinación más rápida, ya que se observó que si se aumentaba la dosis de GA<sub>3</sub> la semilla tenía un menor porcentaje de germinación. Sin embargo Saldívar *et al.*, (2010), observaron que a mayores dosis de GA<sub>3</sub> (0; 50; 100; 150; 200 y 250 mg. L<sup>-1</sup>), el porcentaje de germinación aumenta en semillas de la especie (*Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry), con porcentajes de germinación de 28; 30,33; 41,66; 66,66; 61,33 y 87% respectivamente.

#### **7.1.2. Número de plantas producidas.**

El mayor número de plantas se obtuvo en el tratamiento de semillas escarificadas (T1), obteniéndose 100 plantas; seguido del tratamiento de semillas sin escarificar (T2), con 96 plantas, luego el tratamiento de semillas escarificadas + 1mg. L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (T3), con 88 plantas y el menor número de plantas lo obtuvo el tratamiento de

semillas sin escarificar + 1 mg. L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (T4) obteniéndose 84 plantas . Los resultados anteriores fueron obtenidos al cabo del último día de evaluación (Día 12), es decir, día en el cual no se observó más germinación de semillas (Anexo 10.4). Con lo anterior se puede deducir que para obtener el mayor número de plantas al momento de realizar una prueba de germinación de semillas de mandarina cleopatra, se recomienda realizar el proceso de escarificación, lo cual facilita la germinación.

### **7.1.3. Tiempo de germinación.**

Según los datos de la prueba de germinación, se observa que los días de germinación en los tratamientos es similar (8 días de germinación de semillas), excepto en el tratamiento (T4) de semillas sin escarificar + 1 mg. L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (7 días de germinación) (Tabla 2.). Se pudo apreciar que los días de inicio de germinación (DIG) para los tratamientos de semillas escarificadas + GA<sub>3</sub> (T3), Escarificadas (T1) y Sin escarificar (T2) empezó a partir del día 5. Sin embargo, para el caso de tratamiento de semillas sin escarificar + GA<sub>3</sub> (T4) empezó el día 6. La prueba de germinación tardó 12 días, lo cual fue constatado debido a que no se observó más germinación de semillas. Villega y Andrade (2005). Determinaron que la germinación de semillas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan) (6 meses de almacenamiento), se dió en el transcurso de 30 días y terminó a los 60 días después de su siembra. En este caso puede influir el tiempo de almacenamiento de semillas, ya que en el presente estudio las semillas una vez fueron extraídas de los frutos, no se almacenaron por mucho tiempo, lo que pudo favorecer el tiempo de germinación de semillas de mandarina cleopatra. Siqueira et al. (2002) almacenaron semillas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan) con 10,30; 11,23; 18,41 y 21,42% de agua a temperatura de 5–7°C, y observaron que la germinación fue menor a partir de los 30 días de almacenamiento, de tal manera que a los 60 días obtuvieron sólo el 23% de germinación.

**Tabla 2.** Tiempo de germinación de semillas con cuatro tratamientos (Escarificadas + GA<sub>3</sub> (T3), Sin escarificar + GA<sub>3</sub>(T4), Escarificadas (T1), y Sin escarificar(T2).

TRATAMIENTOS	DIG	DFG	DGS
T3: Escarificadas + GA <sub>3</sub>	5	12	8
T4: Sin escarificar + GA <sub>3</sub>	6	12	7
T1: Escarificadas	5	12	8
T2: Sin escarificar	5	12	8

**DIG:** (día inicio de germinación); **DFG:** (día final de germinación); **DGS** (días de germinación de semillas).

## 7.2. Inducción de yemas en plantas madres.

### 7.2.1. Número de brotes.

En el proceso de inducción de yemas al transcurrir cuatro semanas, se observó que las plantas sometidas a la técnica de poda (T1), tuvieron mayor número de brotes nuevos, observándose de esta manera 27 nuevas yemas, comparado con 11 yemas producidas en las plantas tratadas con 1 mg L<sup>-1</sup> BAP (T2) (Tabla 3.). Según Darrouy *et al.* (2010), tomaron secciones basales de brotes provenientes de árboles de aguacate con y sin poda, se observó un aumento en el grosor del cambium interfascicular y fascicular, que mostraría un posible efecto de la poda y de la posición de la yema dentro del brote. Botero *et al.* (2014) realizaron cortes en las ramas de plantas de cítricos (*Citrus latifolia*, *Citrus sinensis*) en el departamento de Córdoba, observaron el crecimiento de brotes por rama, los cuales oscilaron entre 0,9 y 8,85 brotes/rama en promedio respectivamente. Sin embargo, durante la mayor parte del estudio los niveles de brotación fueron relativamente bajos.

Caso contrario para T2 con las plantas tratadas con 1 mg. L<sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP), se observaron menor número de brotes, con 11 nuevas yemas activas (Tabla 3.). Lo anterior demuestra que es más factible realizar podas en plantas de Naranja

Valencia, con el fin de producir mayor número de yemas. No obstante, algunos autores han observado en sus experimentos resultados favorables con la aplicación de BAP. Jajo (2010), ha demostrado en condiciones *in vitro* que aplicando Bencilaminopurina (BAP) en concentración de 2.22  $\mu\text{m}$ , obtuvieron brotes en plantas de *Citrus limonia* con 18.26 por explante.

Las citoquininas por otra parte activan las yemas que se encuentran en dormancia, produciendo así de esta manera la producción de nuevos brotes. En este caso el estudio de la aplicación de 1 mg.  $\text{L}^{-1}$  de BAP no resultó favorable, demostrándose de esta manera que, realizando podas, se genera mayor número de yemas. Se deduce con lo anterior que, no es necesario aplicar ninguna clase de citoquinina (BAP) para la inducción de yemas.

**Tabla 3.** Número de nuevas yemas en plantas adultas de Naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) sometidas a la técnica de poda (T1) y (T2) tratadas con 1 mg.  $\text{L}^{-1}$  de Bencilaminopurina (BAP).

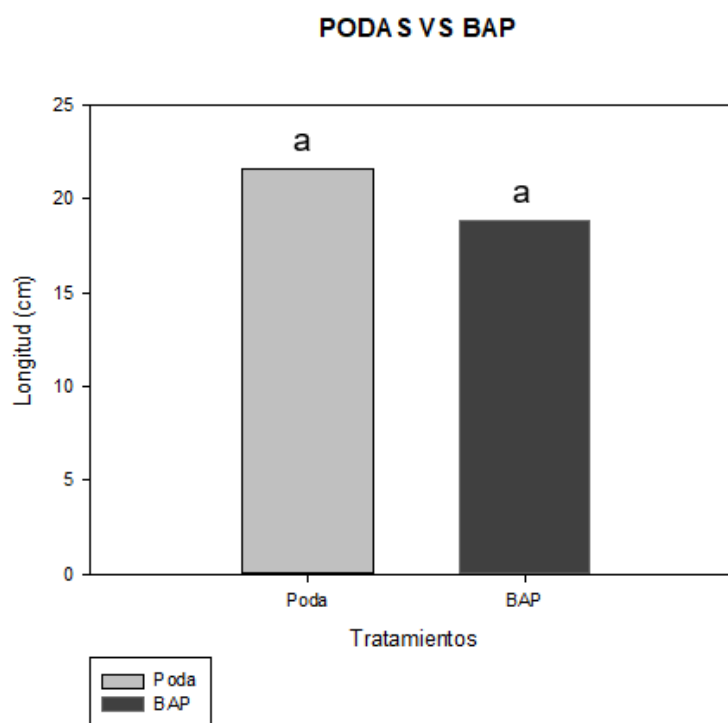
PODAS		BAP (1 mg. $\text{L}^{-1}$ )	
PLANTA	NUEVAS YEMAS	PLANTA	NUEVAS YEMAS
1	5	1	2
2	8	2	2
3	7	3	2
4	4	4	3
5	3	5	2
6	0	6	0
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>	<b>TOTAL</b>	<b>11</b>

### 7.2.2. Longitud y grosor de yemas.

Para el caso de longitud de yemas (cm), y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la prueba t de Student para muestras independientes con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ); se pudo apreciar que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos T1: Podas y T2: BAP ( $P>0,05$ ) (anexo 10.5 ), donde la media

de longitud de yemas para las plantas sometidas a la técnica de podas fue de 21,6 cm y la media para las plantas tratadas con 1 mg. L<sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP) fue de 18,8 cm (Figura 2.).

**Figura 2.** Respuesta de longitud de yemas (cm) a la realización de podas y la aplicación de 1mg.L<sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP) en plantas de Naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.)). \*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba t de Student ( $\alpha=0,05$ )).



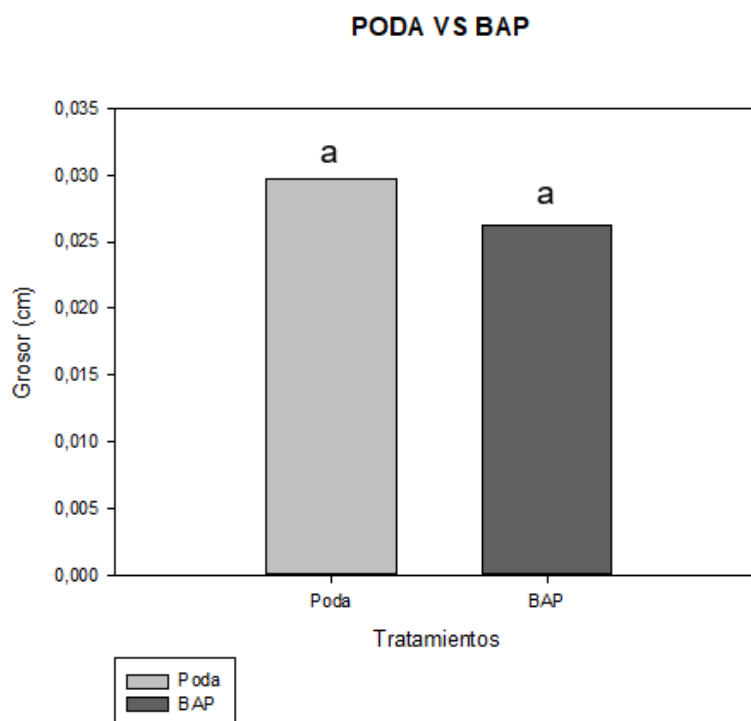
Según Bhagat *et al.* (2012), tuvieron respuesta de regeneración del 75 % de brotes al utilizar 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP en la especie limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush), a nivel *in vitro*, donde se micropropagaron segmentos nodales para patrones de plantas cítricas. Alcanzaron una altura de brotes de 1.8 cm. Estudios realizados por Álvarez *et al.* (2011), utilizando BAP como inductor de crecimiento de yemas en *Gmelina arborea* Roxb, de acuerdo con el efecto de las concentraciones de BAP, los mejores

resultados, en porcentaje de brotación y longitud total, se presentaron cuando se aplicó 0.5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP a las yemas. Arreola et al., (2010) evaluaron la inducción de crecimiento lateral de yemas en *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, a través del despunte de brotes. Encontraron una disminución entre el 38% y el 60% de la longitud de los brotes podados. La inducción de yemas laterales alcanzó una longitud de 32 y 21 cm, como resultado del despunte a 5 y 10 yemas.

Según los resultados obtenidos en la prueba t de Student para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ). Para el caso de grosor de yemas (cm), se observó que no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Podas y BAP) ( $P>0,05$ ) (anexo 10.5). Se puede apreciar que la media para el caso de las plantas podadas fue de 0,030 cm y las plantas tratadas con 1 mg. L<sup>-1</sup> de bencilaminopurina (BAP) fue de 0,026 cm (Figura 3.). De acuerdo con Baldini (1992), la activación del cámbium está directamente ligada con la reactivación de las yemas, la cual ocurre en sentido basípeto en la rama y es controlada por la interacción de reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y giberelinas. Si la relación de auxinas/citocininas cambia con la posición de la yema dentro de la rama, las secciones basales tendrían mayor contenido de citocininas y presentarían una mayor actividad mitótica del tejido cambial, lo que podría explicar el mayor grosor de los brotes.



**Figura 3.** Respuesta de grosor de yemas (cm) a la realización de podas y la aplicación de  $1\text{mg.L}^{-1}$  de Bencilaminopurina (BAP) en plantas de Naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). \*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba t de Student ( $\alpha=0,05$ ).



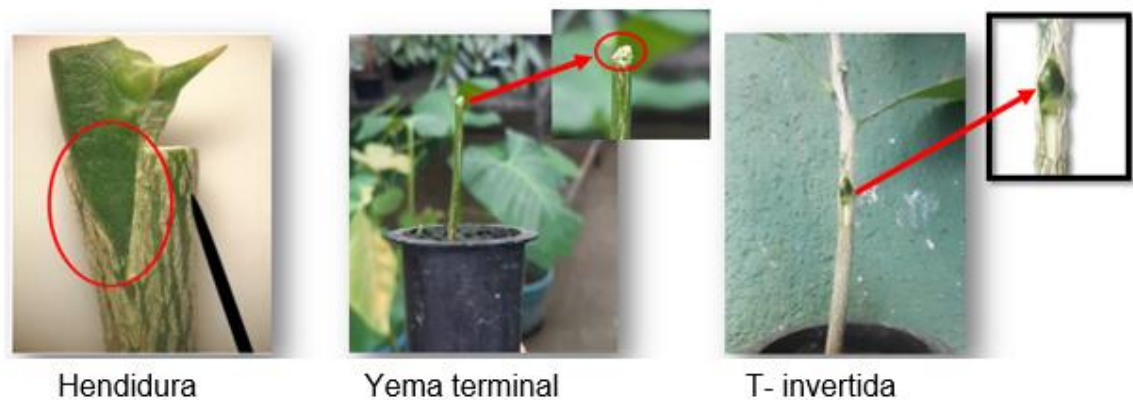
### 7.3. Mini injertos.

#### 7.3.1. Porcentaje de supervivencia de mini injertos.

Las técnicas empleadas de injerto de hendidura (T2), T invertida (T3) y yema terminal (T1) (Figura 4) presentaron variación en los porcentajes de éxito. La Tabla 4 muestra los resultados de los porcentajes de éxito obtenidos con las diferentes técnicas de mini injertación aplicadas. Se puede observar que el porcentaje de éxito para los mini injertos con el método hendidura fue del 75%, seguido por el de T-invertida con 37.2% y finalmente el de yema terminal con ausencia total de éxito (0%). Estos resultados tienen correspondencia a los obtenidos por Alexandre *et al.*

(2013), obtuvieron mini injertos exitosos con el método de hendidura en cultivares de *P. edulis* f. *flavicarpa*/*P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis*/*P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata*/*P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. mucronata*/*P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. foetida*/*P. edulis* f. *flavicarpa* fueron 90, 90, 68, 80 y 90%, respectivamente. Los mini injertos que fueron exitosos presentaron buenas características fenotípicas como se observa en la figura 5.

**Figura 4.** Diferentes técnicas de mini injertación en plantas de Naranja valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.).



**Tabla 4.** Datos generales de mini injertos en plantas de Naranja Valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck.).

DATOS GENERALES MINI INJERTOS NARANJA VALENCIA ( <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck.)			
MÉTODOS	% ÉXITO	TAMAÑO YEMA PROMEDIO (cm)	# DE HOJAS PROMEDIO
HENDIDURA	75	3	5
T- INVERTIDA (Miniescudete)	37,2	2,9	3
Y. TERMINAL	0	0	0

**Figura 5.** Mini injerto con el método hendidura, con buenas características fenotípicas de Naranja valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.).



Para el caso de mini injertos con la técnica de mini injertación hendidura, se pudo observar que es necesario generar la mayor superficie de contacto entre los dos cambiums vasculares y la yema a injertar, con el fin de obtener el mayor porcentaje de éxito de mini injertos. La figura 6 muestra la yema insertada en el patrón. Esto puede explicar el alto porcentaje de eficiencia por parte de este método de mini injertación.

**Figura 6.** Yema en contacto con cambiums vasculares del patrón de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan).

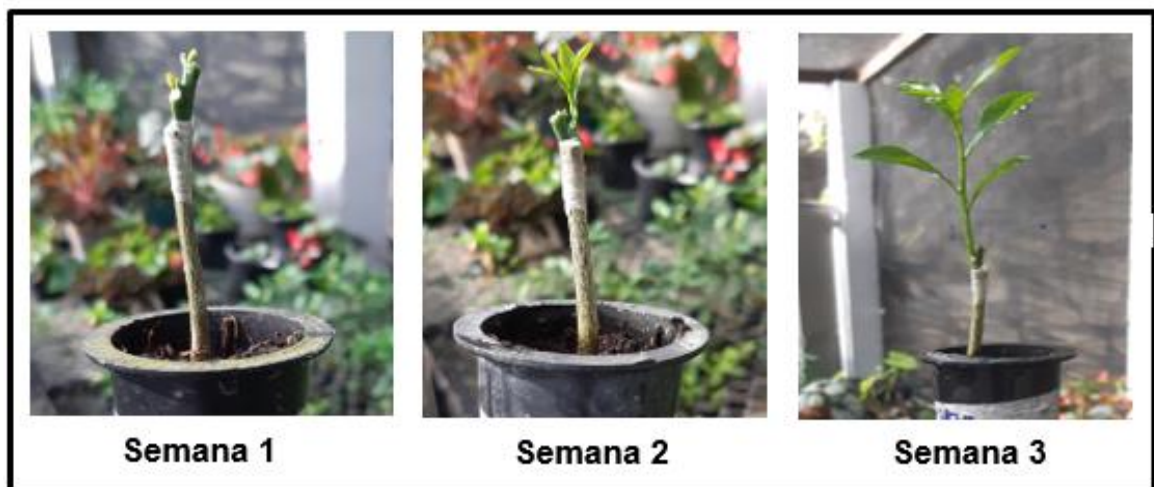


La unión de los mini injertos está formada inicialmente por la división de las células del callo, originalmente del injerto y patrón, que se diferencian aún más para formar el cambium vascular. Tres etapas consecutivas ocurren en el éxito del proceso de mini injerto: la adhesión entre el injerto y el patrón, proliferación de células de callo, y diferenciación vascular en la interfase de injerto (Hartmann *et al.*, 2011).

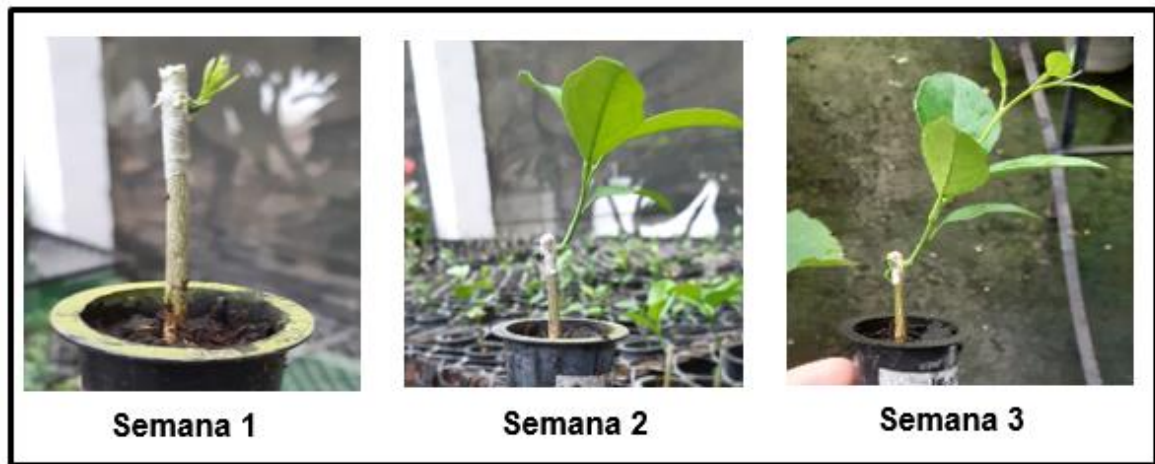
Con los datos obtenidos de porcentaje de éxito, se deduce que el mejor método para realizar mini injertos es hendidura. Alcanzó el mayor porcentaje de éxito de los injertos realizados, el cual se recomienda para la propagación asexual de plantas cítricas a través de la técnica de mini injertación.

Una vez observados los resultados de los métodos de mini injertación que fueron exitosos (hendidura y T -invertida), se pudo apreciar el desarrollo de estos durante el periodo de evaluación (3 semanas) (Figuras 7 y 8). Para el método de hendidura se observaron las yemas en su proceso de crecimiento, dicho proceso se observó al cabo de 8 días después de realizar los injertos. Para el método T- invertida, al cabo del día 8 después de realizar los mini injertos, se observó el inicio del crecimiento de los brotes, que para ello fue necesario realizar el proceso de “agobio”, con el fin de facilitar y permitir el paso de asimilados a la yema injertada (Figura 9). Según Young (2004) el agobio ayuda al aporte de auxinas, las cuales facilitan la brotación de las yemas.

**Figura 7.** Crecimiento y desarrollo de yemas de mini injertos con el método hendidura.



**Figura 8.** Crecimiento y desarrollo de yemas de mini injertos con el método T-invertida (Miniescudete).



**Figura 9.** Mini injerto del método T- invertida (Miniescudete) sometido a la técnica de agobio.



Según Scatena y Scremin (2006), la división que retiene la capacidad de las células adultas del parénquima juega un papel clave en la curación o la regeneración de lesiones como el injerto. Este proceso es posible dada su capacidad inherente de ser reprogramado al estado citológico meristemático, que la diferencia de otros tipos

de células. Las nuevas células parenquimatosas crecen tanto en el injerto como en el patrón llenando el espacio entre la ranura y el injerto (Pina y Errea, 2005). Aquí, las células divisorias pertenecen al parénquima medular del injerto, a las células del parénquima de la xilema y también a las cambiantes. Este hecho está relacionado con el hecho de que las células derivadas de las zonas activas de crecimiento del injerto son de alguna manera más jóvenes, y mucho más sensible a las lesiones debidas a una posible mayores tasas de división con respecto a las del patrón; además, este tejido tiene un alto contenido de auxina endógena que induce el proceso mitótico junto con la citoquinina (Taiz y Zeiger, 2013), lo que repercute positivamente en la efectividad de la curación en la región del injerto.

Lo mencionado anteriormente es relevante en este caso, ya que del éxito de los mini injertos va a depender de la curación y posterior cicatrización del injerto, para ello en nuestro experimento fue de gran ayuda el Parafilm®, el cual sirve para asegurar la unión del injerto, también ayuda a cicatrizar la parte injertada y evita la deshidratación de los brotes y las yemas. En la figura 10 se puede apreciar los mini injertos fijados en la zona injertada con Parafilm®, los cuales fueron exitosos. En un estudio realizado por Oliari *et al.* (2016), el Parafilm® proporcionó un mayor apego (89,57%) del mini injerto entre *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. mucronata*.



**Figura 10.** Mini injertos del método Hendidura fijados con Parafilm®.



El Parafilm® ayuda a disminuir la deshidratación en las yemas injertadas, ya que, en el injerto, el brote proveniente de las yemas de injertos exitosos es el principal órgano para la pérdida de humedad. Otro aspecto importante en cuanto al éxito de los injertos es la destreza que tenga el injertador, de eso va a depender los resultados favorables, también es relevante la edad del patrón que se va a utilizar, en este caso se utilizaron patrones de seis meses de edad, hasta que alcanzaran el diámetro adecuado para realizar los mini injertos. Según De Pasquale (1999) en un estudio en cítricos, lograron porcentajes de éxito de los mini injertos oscilaron entre el 27,5% ('Tardivo di Ciaculli' mandarina injertada en Mandarina cleopatra de 6 meses) y el 100% ( Naranja agria injertada en una naranja agria de 18 meses, y "Femminello Comune" limón injertado en una naranja agria de 18 meses y una mandarina Cleopatra de 18 meses) La mandarina 'Tardivo di Ciaculli' mostró el menor porcentaje de éxito, 63%, mientras que el porcentaje más alto, 96%, se observó con el limón "Femminello Comune". Los patrones de Naranja agria produjeron mayores porcentajes de mini injertos exitosos que la mandarina

Cleopatra. Observaron también que la probabilidad de éxito de las uniones de injertos aumentó con la edad del patrón. Cuando el patrón tenía 6 meses de edad, el 81,3% y el 68,1% de las uniones de injertos tuvieron éxito en comparación con el 96,3% y el 86,9% cuando el patrón tenía 18 meses de edad (respectivamente en Naranja agria y mandarina Cleopatra).

Con el método de mini injertación T-invertida (Miniescudete), se pudo determinar un porcentaje de éxito de 37,2; como lo muestra la tabla 5. Además, se pudieron observar los mini injertos que resultaron exitosos (Figura 11). Estos mini injertos se observaron con buen vigor y buenas características fenotípicas (Figura 12). Mendoza *et al.*, (2004), obtuvieron a través de la técnica de microinjerto en plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. osbeck) con el método T invertida porcentajes de prendimiento de 0 y 10,3%, sobre el patrón CitrangeTroyer (*Poncirus trifoliata* L. Raft.).

**Figura 11.** Mini injertos exitosos del método T-invertida (Miniescudete).





**Figura 12.** Mini injerto vigoroso del método T- invertida (Miniescudete).



Para el caso del método Yema terminal no se observaron resultados positivos respecto al porcentaje de éxito, con un 0% de eficiencia, se observó en el experimento que al momento de realizar preliminares de mini injertos con este método, no hubo prendimiento de la yema con el patrón (Figura 13), las yemas puestas en el cilindro radial del patrón se deshidrataron, considerando de esta manera que los injertos con el método de injertación antes mencionado fueron fallidos, por lo que no arrojaron resultados favorables en este caso (Figura 14). Sin embargo, Navarro (1979) en su estudio realizado en cítrico (agrio) en condiciones *in vitro* obtuvo que con el método de colocación del ápice en el patrón influye significativamente en el grado de prendimiento. Los mejores resultados se obtuvieron mediante la colocación del ápice sobre el anillo vascular en la superficie de corte del epicotilo decapitado o en la incisión realizada en la parte superior del epicotilo, método similar al utilizado en este estudio con el método yema terminal. El éxito del injerto es dependiente de la pérdida de humedad de las yemas (Rongting y Pinghai, 1990; 1993). Rongting y Pinghai (1993) demostraron que, si la humedad de los nuevos brotes se reduce a menos del 38%, por ende, la formación de callo en la unión del injerto se detiene. De esta manera lo mencionado anteriormente, pudo influir en el no prendimiento de yemas. Otro aspecto que pudo influir en el

prendimiento de las yemas, pudo haber sido la poca superficie de contacto entre el patrón y la yema injertada, no se produjo curación y el tejido parenquimatoso no llenó los espacios libres patrón/yema, produciendo de esta manera deshidratación de yemas y no efectividad de este método de mini injertación. Esta investigación sirvió para tener en cuenta que el método yema terminal es descartado como técnica de propagación de plantas cítricas. Por otro lado, se puede afirmar que los tubos Eppendorf®, no crearon el microclima adecuado para que la yema no se deshidratara con facilidad, lo que repercute negativamente en el prendimiento de yema con el patrón.

**Figura 13.** Mini injerto fallido con el método yema terminal.



**Figura 14.** Yema apical deshidratada.

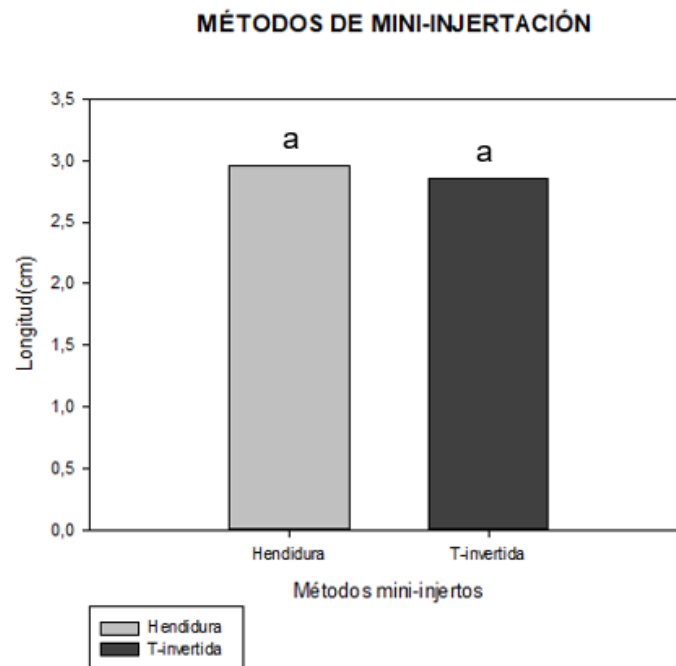


### 7.3.2. Longitud de yemas y número de hojas.

En el caso de longitud de yemas (cm), y según los datos obtenidos y posteriormente distribuidos con una prueba t de Student para muestras independientes con un nivel de significancia ( $\alpha = 0,05$ ). Se observó que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos evaluados (métodos T-invertida y Hendidura)  $P > 0,05$ ; con promedios de 2,9 y 3 cm respectivamente (anexo 10.6). La figura 15 muestra los resultados obtenidos de la variable longitud de yemas, con promedios similares como se mencionó anteriormente. Karnataka (2012) obtuvo 'Sardar' injertado plántulas de

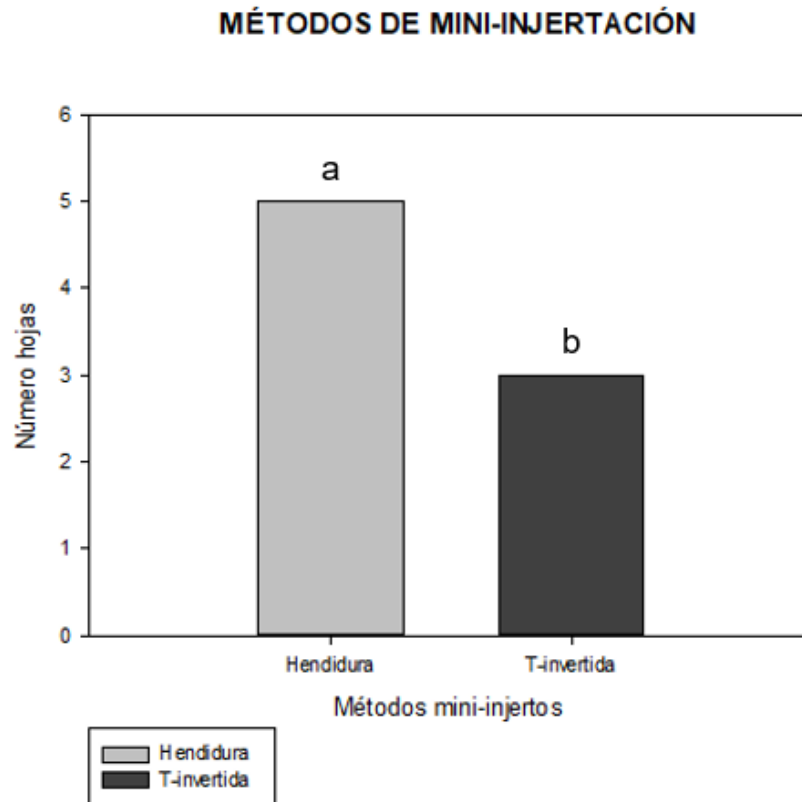
guayaba (*Psidium guajava* L.) con un promedio de hasta 22 cm de altura y 15 hojas a los 120 días después del injerto.

**Figura 15.** Longitud de yemas (cm) comparado en dos métodos de mini injertación (Hendidura y T-invertida (Miniescudete) \*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba t de Student ( $\alpha=0,05$ ).



Para el número de hojas, fue necesario distribuir los datos a través de la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ), donde se pudo observar diferencias estadísticas significativas  $P<0,05$  entre los tratamientos (T-invertida (miniescudete) y Hendidura), con promedios de 3 y 5 hojas respectivamente (anexo 10.7). Los promedios en este caso fueron diferentes. Donde se aprecia que los tratamientos con letras diferentes difieren estadísticamente (Figura 16).

**Figura 16.** Número de hojas comparado con dos métodos de mini injertación (Hendidura y T-invertida). \*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba Wilcoxon ( $\alpha=0,05$ ).



Campos *et al.* (2017), obtuvieron en plantas de guayaba (*Psidium guajava* L.) valores que fueron alrededor de 22,2 cm y 14 hojas en 120 días después del mini injerto. Por otro lado, Mendes *et al.*, (2019) obtuvieron valores promedios de número de hojas de 8,23 y 8,14 a los 120 días luego de haber realizado los mini injertos en dos variedades de Citrandarinas, donde no observaron diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, en el mismo estudio con obtuvieron en tres cultivares de cítricos número de hojas promedio (23; 10,9 y 18,9) a los 120 días luego de realizar los mini injertos, en este caso si hubo diferencias estadísticas significativas en los tres cultivares evaluados.

En la literatura pocos estudios han evaluado la técnica de mini injertación aplicada a las especies de cítricos (Mendes *et al.*, 2019). Sin embargo, la realización en otras especies frutales ya mencionadas anteriormente, han servido como guía para tener certeza de que la técnica de mini injertos es de suma importancia para solucionar algunas problemáticas en cuestiones fitosanitarias, de tiempo, espacio y por supuesto la disminución de costos de producción en comparación al injerto convencional. Mendes *et al.*, (2019), también afirman que la mini injertación puede ser una nueva opción para la propagación de los cítricos.

## 8. CONCLUSIONES

El tratamiento T1 (semillas escarificadas sin GA<sub>3</sub>) alcanzó el mayor porcentaje de germinación (100%), en semillas de Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan). Se observó que es necesario escarificar las semillas para facilitar su germinación.

La realización de podas en plantas adultas de Naranja Valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck) es necesaria para obtener mayor número de brotes.

La técnica de mini injertación hendidura fue la mejor, alcanzó el mayor porcentaje de supervivencia (75%), seguido de la técnica T invertida (miniescudete) 37,2% y la técnica yema terminal 0%.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Agropecuaria. (2016). *El cultivo de la naranja Valencia (Citrus sinensis (L.) Osbeck) y su producción como respuesta a la aplicación de correctivos y fertilizantes y al efecto de la polinización dirigida con abeja (Apis mellifera)*. Boletín mensual. Insumos y factores asociados a la producción Agropecuaria. Núm. 52.
- Agustí, M. (2003). Citricultura. Ediciones Mundi Prensa. 2da Edición. Madrid. 5p
- Alexandre, R., Lopes, J., Tiradentes, A., Bruckner, C., y Otoni, W. (2013). Metodologia de minienxertia em maracujazeiros. Revista Brasileira de Fruticultura, 35(1), 329-332. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000100040>
- Álvarez, J., Beltran, D., y Mesa, N.(2011). Evaluation of plant growth regulators in organogenesis of *Gmelina arborea* roxb. Revista Tumbaga. p115
- Amórtegui, I., Capera, E y Godoy, J. (2001). *El cultivo de los cítricos. Módulo educativo para el desarrollo tecnológico de la comunidad rural*. Ibagué-Colombia: Corporación para la Promoción del Desarrollo Rural y Agroindustrial de Tolima – PROHACIENDO.
- Anderson, C., Banfi, G., Beñatena, H., Casafus, C., Costa, N., Danos, E...(1996). *Manual para Productores de Naranja y Mandarina*. Recuperado de:[https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp\\_inta\\_manual\\_citricultura\\_tapaycont.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp_inta_manual_citricultura_tapaycont.pdf)
- Andrade, R. y Martins, A. (2003). Propagação vegetativa de porta-enxertos para

citros. Revista Brasileira de Fruticultura, 25(1), 134-136.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000100038>

Arreola, J., Lagarda, A., y Borja, A. (2010). Induction of lateral growth in pecan trees (*Carya illinoensis* K. Koch) by tipping shoots in spring. - *Revista Chapingo Serie Horticultura* 31(6), 31-36

Baldini E. (1992) Arboricultura General. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 379 p.

Bangerth, F., y Gruber, J. (2000). Mutual interaction of auxin and cytokinins in regulating correlative dominance. *Plant Growth Regulation*, 32:205–217.

Bayer, R., Mabberley, D., Morton, C., Miller, C., Sharma, I., Pfeil B., Rich, S., Hitchcock, R y Sykes, S. (2009). A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *American Journal of Botany* 96(3):668-685.

Bhagat, A., Pati, K., Virk, G. y Nagpal, A. (2012). An efficient micropropagation protocol for Citrus jambhiri Lush. and assessment of clonal fidelity employing 73 anatomical studies and RAPD markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 48(5), 512-520.

Botero, V., Ochoa, A., Gastón, J., Ortiz, A., Fuel, M., Moná, E., Mejía, L., Guarín, J., Orduz, J., Chaparro, H y Arévalo, E. (2014). *Identificación de la dinámica poblacional de Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae) en los cultivos de cítricos de Colombia: una herramienta para implementar un sistema piloto de seguimiento de poblaciones del insecto vector del HLB*. Recuperado de: [file:///C:/Users/Asus/Downloads/110858\\_67831.pdf](file:///C:/Users/Asus/Downloads/110858_67831.pdf).



- Bonner, F. (1974), Seeds of Woody Plants in the United States. U.S.D.A. Agricultural Handbook 450: 862-863.
- Campos, G., Marinho, C., Portella, C., Amaral, B. D., y Carvalho, W. (2017). Production of guava mini-grafted on intra or interspecific rootstock. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(1), 630-635. <https://doi.org/10.1590/0100-29452017635>
- Carvalho, S., Graf, C. y Violante, A. (2005). Produção de material básico e propagação. Citros, Cap. de Livro, 38 p.
- Corbineau, F., Xia, C. y El-Maarouf-Bouteau, H. (2014). Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front. Plant Sci.* 5, 1-13. Doi: 10.3389/fpls.2014.00539
- CORPOICA. (2012) Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización. Caldas: Corporación Universitaria Lasallista. 367 p.
- DANE. (2016). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Boletín informativo. Cundinamarca, Bogotá. Núm. 52. pp.1
- Darrouy, N., Castro, M., Cautín, R., Kort, L., y Bozzolo, R. (2010). Efecto de la posición de la yema y de la poda en plantas de aguacate destinadas a la clonación. *Revista fitotecnica mexicana*, 33(3), 249-256
- De Pasquale, D. (1999). Minigraft of shoots, roots, inverted roots and somatic embryos for rescue of *in vitro citrus regenerants*. *J. Amer, Soc. Hort.Sci.*124(2):152-157.
- Dibbern, C. (2009). *Rol de los viveros cítricos en la estrategia para el manejo de*

HLB. 2p. Recuperado de: <http://www.calcitrusquality.org/wp-content/uploads/2009/05/Cesar-Graft-Rol-de-los-Viveros-en-la-estrategia-contra-HLB.pdf>

Duarte, O., Villagarcia, J., y Franciosi, R. (1974). Efecto de algunos tratamientos en la propagación del chirimoyo por semillas, estacas e injertos. Proc. Tropical Región American Society for Horticultural Sciences. 18: 41-48.

Earth, U. (2004). Perfil de Producto Naranja. Universidad Earth p. 4 Recuperado de: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/50000142.pdf>.

Ewens, M., y Felker, P. (2003). The potential of mini-grafting for large scale comercial production of Prosopis alba clones. Journal of Arid Environments, 55(2), 379-387.

Espinal, C., Martínez, H., y Marín, Y. (2005). *La cadena de cítricos en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica*. N° 66. Recuperado de: [http://www.asohofrucol.com.co/archivos/Cadenas/caracterizacion\\_citricos\\_2005.pdf](http://www.asohofrucol.com.co/archivos/Cadenas/caracterizacion_citricos_2005.pdf)

FAO. (2009). Estadísticas FAOSTAT base de datos con datos procedentes de la FAO, la OIT y el Banco Mundial. En: <http://faostat.fao.org>.

FAO. (1991). Guía para la manipulación de semillas forestales, con especial referencia a los trópicos. Estudio FAO, MONTES. "N° 2012. 502 p.

Farsi, M., Moghadam, M., Zamani, Z., Hassani, D., y Ahmadi, A. (2016). The histology of minigrafting of Persian walnut trees cv. Chandler. International Journal of Horticultural Science and Technology, 3(2), 167-177.

- Ferguson, B. Y Beveridge, C. (2009). Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching. *Plant Physiology*, 149: 1924-1944.
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. Basingstoke, UK. Vol.1; 2° Ed. Springer.
- Gravina, T. (1989). Características viveristas en nueve portainjertos de cítricos. *Revista Chapingo*, v.13/14, p.133-136.
- Hartmann, H., Kester, D., Davies, J. y Genever, R. (2011). *Plant propagation: principles and practices*. 8 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 915p.
- Hartmann, H. (2013). *Plant propagation: Principles and Practices* 8th edition. Pearson Education Limited, 509-558.
- Hermann, K., Meinhard, P., Pesek, B., Machackova, U. y Leubner, M. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) – A comparative study of fruits and seeds. *J. Exp. Bot.* 58, 3047-3060. Doi: 10.1093/jxb/erm162
- Hernández, D., y Rodríguez, J.(2014). Características climáticas y balance hídrico de la lima ácida Tahití (*citrus lantifolia* Tanaka) en cinco localidades productoras en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(2)pp.217-229.
- ICA. (2017). *Transparencia-participación-y-servicio-al-ciudad-/ Rendición de cuentas/ Audiencia pública de rendición de cuentas Córdoba-pdf.aspx?lang=es-CO*. Fecha: 03-11-2017.

- ICA. (2018). El ICA toma medidas en Norte de Santander por la presencia del HLB de los cítricos. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, Norte de Santander. cucuta: Archivos para prensa y medios de comunicación. Recuperado de <https://www.ica.gov.co/movil/noticias/8146.aspx>
- ICA. (2019). *Para sacarle el mejor “jugo” a la cosecha, el ICA y los productores hacen equipo para prevenir el HLB de los cítricos*. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/noticias/ica-citricultores-equipo-prevenir-hlb-citricos>. Fuente ICA.
- ICA. (2020). *VIVEROS-REGISTRADOS. Certificación de semilla*. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/getdoc/08d0b08f-f704-4e0fbfb214f861fb5215/certificacion-de-semillas.aspx>. Accedido: 15-03-2020
- Jajo, A. (2010). In vitro propagation of *Citrus limonia* Osbeck through nucellar embryo culture. Curr. Res. J. Bio. Sci, 2(1), 6-8.
- Jaramillo, A., Martínez, M., Cardozo, C y Burgos, J. (2012). Determinación de condiciones controladas de almacenamiento seguro para semillas de portainjertos de lima ácida ‘Tahiti’. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 13(2), 151-158.
- Kalil, A., Hoffmann, H., y Tavares, F. (2001). Mini-garfagem: Um novo método para a enxertia do mogno sul-americano (*Swietenia macrophylla* King), Comunicado Técnico, 62, 4. Embrapa Florestas: Colombo, PR, Brasil.
- Karnataka, J. (2012). Effect of pre-curing of scion on softwood grafting success in guava. *Agriculture Science, Bagalkot*, v.25, n.2, p.289-290.
- Lemos, J., Pereira, J., Medrado, M., Costa, J., y Pinto, H. (1994). Minienxertia da

seringueira (*Hevea* spp.): problemas e avanços na técnica. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 29(5), 779-784.

Li, X., Xie, R, Lu, Z y Zhou, Z. (2010). The origin of cultivated citrus as inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequence and amplified fragment length polymorphism fingerprints. J. Amer Sc. Hort. Sci. 135(4):341-350.

Liu, Y, Heing, E y Tanumihardjo S. (2012). History, global distribution and importance of citrus fruits. Comprehensive Reviews in food science and food safety, 11, doi: 10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x

Martínez, B., Iglesias, C., Mesejo, C., Agustí, M. Y Primo, E. (2015). Carbon utilization by fruit limits shoot growth in alternate-bearing citrus trees. Journal of Plant Physiology, 176:108-117.

Mas, C., Del Valle, N., Herrera, L., Campos, A., Ríos, A., Acosta, M. y Dita, M. (1995). Conservación de semillas de patrones cítricos. *Centro Agrícola*, (22), p.5-9.

Mendes, M., Souza, A., Costa, M., Soares, W., Gesteira, A. y Silva, H. (2019). Adjusting the Minigrafting Technique Applied to Citrus by Using Rootstocks Grown *in vitro*. Journal of Agricultural Science; Vol. 11, No. 11

Mendoza, G., Villalba, N y González, L. (2004). Obtención de plantas de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L) osbeck v.folha murcha). Libres del virus de la Psorosis a través de termoterapia y microinjerto de ápices caullnares *in vitro*. *Investigación agraria* (6)(1), 17.

MINCIT. (2018). *Comportamiento del Mercado Nacional e Internacional de Cítricos Frescos*. Recuperado de: file:///C:/Users/User/Downloads/Comportamiento\_Mercado\_Nacional\_Internacional\_c%C3%ADtricos\_frescos.pdf. Fuente Cadena de los Cítricos MADR.

Minagricultura. (2017). *ÁREA SEMBRADA, ÁREA COSECHADA, PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE CÍTRICOS SEGÚN DEPARTAMENTO 2016-2017*. Recuperado de: [https://www.agronet.gov.co/Documents/8-C%C3%8DTRICOS\\_2017.pdf](https://www.agronet.gov.co/Documents/8-C%C3%8DTRICOS_2017.pdf). Fuente: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Secretarías de Agricultura Departamentales. Alcaldías Municipales.

Ministerio Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). *CADENA DEL CÍTRICOS INDICADORES E INSTRUMENTOS*. Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. Recuperado de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Citricos/Documentos/2019-06-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>.

Miransari, M. y D.L. Smith. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99, 110-121. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.11.005

Moore, R. (1984). A Model For Compatibility/Incompatibility in Higher Plants. *Am. J. Bot.* 71(5): 752-758.

Moubayidin, L., Perilli, S., Dello, R., Mambro, R., Costantino, P. y Sabatin, S. (2010). The Rate of Cell Differentiation Controls the Arabidopsis Root Meristem Growth Phase. *Current Biology*, 20:1138-1143.

Navarro, L. (1979). Micro injerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agrios libres de virus. *Bol. Serv. Plagas*, 5: 127-148.

Naz, A. (2007). *In vitro* studies on micrografting technique in two cultivars of citrus

to produce virus free plants. Pakistan Journal of Botany 39(5):1773- 1778.

Nieves, N., Blanco, M., Borroto, E., Gonzalez, J., Lorenzo, J, Borroto, C., Gonzalez, A., Guerra, O. y Quiñónez, J. (1995). Caracterización bioquímica de la semilla botánica y el proceso de germinación en Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan). Cultivos Tropicales, vol ( 16), p.24-29.

Oliari, L., Giles, J., Mayrinck, L., Oliveira, J., Lopes, J., Otoni, W., y Alexandre, R.(2016). Mini-grafting of adult *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. scions onto vegetatively propagated adult rootstocks of *P. mucronata* Lam. Australian Journal of Crop Science, 10(4), 490-496. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.04.p7156x>

Orduz, J. y Garzón, D. (2012) Alternancia de la producción y comportamiento fenológico de la naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) en el trópico bajo húmedo de Colombia. Libro, vol. ( 13) no.2

Palencia, G., Mercado, T. y Combatt, E. (2006). Estudio Agrometeorológico del Departamento de Córdoba. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba. Gráficas del Caribe. 126 p.

Pina A y Errea, P. (2005) A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. Sc Hortic. 106: 1-11.

Raharjo, S. (2003). Rescue of genetically transformed avocado by micrografting. *Proceedings V World Avocado Congress. Granada - Málaga, Spain. Vol. ( 1).* p 19.

Rehman H, Gill M. (2015). Micrografting of fruit crops – A review. Journal of

- Rongting, X., y D. Pinghai. (1993). A Study on the Uniting Process of Walnut Grafting and the Factor Affecting. *Acta. Hort.* 311: 160-172.
- Rongting, X., and D. Pinghai. (1990). Theory and Practice of Walnut Grafting. *Acta. Hort.* 284: 69- 90.
- Saldívar, P., Laguna, A., Gutiérrez, F y Domínguez, M. (2010). Acido Giberélico en la Germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry *1 Agronomía Mesoamericana* 21(2):327-331
- Scatena V. y Scremin, E. (2006) Parênquima, colênquima e esclerênquima. In: Appezzato-da-Glória B, CarmelloGuerreiro SM. *Anatomia vegetal*. 2 ed. Viçosa: UFV, 430p.
- Segantini, L., Dutra, J., Mayrinck, L., Bestete, J., Lopes, L., Otoni, W., Romais, E., Mitsuko, E y Sobreira, R. (2016). Mini-grafting of adult *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. scions onto vegetatively propagated adult rootstocks of *P. mucronata* Lam. *Australian Journal of Crop Science*. p 490-494 DOI: 10.21475/ajcs.2016.10.04.p7156x.
- Sempionato, O. (1997). *Viveiro de citros. Jaboticabal*: Funep. (Boletim Citrícola, nº 2). Recuperado de:  
[http://www.estacaoexperimental.com.br/documentos/BC\\_02.pdf](http://www.estacaoexperimental.com.br/documentos/BC_02.pdf)
- Stenzel, N., Filho, A., Carvalho, S., Carneiro, R., Marlot, E., Assumpção, L., Pereira, L., Siqueira, D., Hauagge, R y Postiglioni, S. (1992). A citricultura no Paraná. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná. p.117-137



- Siqueira, D., Vasconcellos, J., Dias, D. y Pereira, W. (2002). Seed germination of citrus rootstocks after cooling conditions storage. *Revista Brasileira de Fruticultura*, (24), p.317- 322.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). El papel fisiológico de las auxinas, en: Fisiología vegetal Vol.II. Editorial Publicacions de la Universitat Jaume I, Castelló de la Plana. 961- 976.
- Taiz L y Zeiger E. (2013). Fisiologia vegetal. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 918p
- Teófilo, J. (1991). Propagação de citros. In: Rodriguez, O. (ed). Citricultura brasileira. Campinas: Fundação Cargill, vol ( 1) p. 281-301.
- Valentini, G.y Arroyo, L. (2003). *La injertación en frutales*. San Pedro, Buenos Aires. Boletín de Divulgación Técnica n°14 Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12123/6481>
- Villagran, L. (1999). Efecto de la escarificación y del ácido giberélico en la germinación del canistel (*Pouteria campechiana*, Baehni). Tesis de Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. 1p.
- Villegas, A. y Andrade, M. (2005). Secado y almacenamiento de semillas de mandarino 'Cleopatra'. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, (40), (1) p.79-85
- Wendling, I. y Hoffmann, H. (2005). Minienxertia em casa de vegetação: nova metodologia para propagação vegetativa de *Ilex paraguariensis*-Resultados Preliminares. Comunicado Técnico, 132 (p. 6). Embrapa Florestas: Colombo, PR, Brazil.

Xavier, A., Santos, G., Wendling, I y Oliveira, M. (2003). Propagação vegetativa de cedrorosa por miniestaquia. Revista Árvore, Viçosa, MG, v.27, n.2, p.139-143.

Young, A. (2004). Técnicas de formación y manejo del rosal Cultivos Tropicales, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba. vol. 25, núm. 4, pp. 53-60

## 10. ANEXOS

- 10.1. Planta adulta de Naranja valencia de vivero comercial “FERJA DE FRUTALES” con Registro ICA: 25290-06V.



- 10.2. Prueba estadística ANAVA en prueba de germinación de semillas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan) .

### Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
T1	3	299	100	0,33
T2	3	289	96	16,33
T3	3	264	88	1
T4	3	251	84	4,33

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	488,9166667	3	162,9722222	29,63131313	0,000110516	4,066180551
Dentro de los grupos	44	8	5,5			
Total	532,9166667	11				

**10.3.** Prueba de Tukey (HSD) para prueba de germinación en semillas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan).

HSD=	6,13
Valor crítico prueba Tukey ( $q\alpha$ )=	4,53
MSe=	5,5
n=	3

Donde; HSD (Diferencia honestamente significativa); MSe (Cuadrado medio del error) y n (número de elementos por grupo).

Tratamientos	T1	T2	T3	T4
T1		4a	12b	16b
T2			8b	12b
T3				4b
T4				

**10.4.** Datos de prueba de germinación de semillas de mandarina (*Citrus reshni* Hort ex Tan).

	<b>DÍAS DE GERMINACIÓN</b>							
<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>Semillas escarificadas + GA3</b>	44	52	60	64	80	84	84	88
<b>Semillas sin escarificar+ GA3</b>	0	24	44	52	64	72	76	84
<b>Semillas sin escarificar</b>	40	48	60	68	72	80	88	96
<b>Semillas escarificadas</b>	8	32	48	64	76	80	92	100

**10.5.** \* Prueba t de Student para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) para las variables longitud y grosor de yemas (cm).

<b>Tratamiento</b>	<b>Longitud (cm)</b>	<b>Grosor (cm)</b>
<b>Poda</b>	21,59	0,02974074
<b>BAP</b>	18,82	0,02627273
<b>Estadístico t</b>	0,95099	0,96112
<b>P-Valor</b>	0,3479	0,3429

- 10.6.** \* Prueba t de Student para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) para la variable longitud de yemas (cm).

<b>Método</b>	<b>Longitud (cm)</b>
<b>T- Invertida</b>	2,859259
<b>Hendidura</b>	2,959091
<b>Estadístico t</b>	0,26573
<b>P-Valor</b>	0,9175

- 10.7.** \* Prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras independientes, con un nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ) para la variable número de hojas.

<b>Método</b>	<b>Número de hojas</b>
<b>T- Invertida</b>	3
<b>Hendidura</b>	5
<b>Estadístico W</b>	320,5
<b>P-Valor</b>	0,001473